

## بررسی توزیع ژن‌های مولد بیوفیلیم در باکتری استافیلوکوکوس ارئوس در شیر خام تعدادی از کارخانه‌های لبنی شهر تهران در زمستان ۱۳۹۵

بهاره هندیجانی<sup>۳،۱</sup>، امیر شاکریان<sup>۳،۲\*</sup>، ابراهیم رحیمی<sup>۳،۲</sup>، فرحمن صالح‌زاده<sup>۴</sup>

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه

آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲. 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

۴. دفتر نظارت بر بهداشت مواد غذایی، سازمان دامپزشکی کشور، تهران، ایران

\* نویسنده مسئول مکاتبات: amshakerian@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۶/۶/۱۵ پذیرش نهایی: ۹۶/۸/۳۰)

### 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 بیوفیلیم می‌باشد. این باکتری توانایی تولید پلی ساکاریدها و فاکتورهای پروتئین چسبیده به سطح را دارد که سبب تولید بیوفیلیم می‌گردد. در این مطالعه به منظور بررسی آلودگی شیرخام شهر تهران به باکتری استافیلوکوکوس ارئوس و توزیع ژن‌های مولد بیوفیلیم، 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. به منظور تشخیص تأییدی جدایه‌ها به‌عنوان استافیلوکوکوس ارئوس ژن اختصاصی *nuc* برای شناسایی ژن‌های مولد بیوفیلیم *icaA*، *icaD* و *clfB* از پرایمرهای اختصاصی مربوط به هر ژن استفاده گردید. با توجه به نتایج حاصل از کشت میکروبی و تأیید آن با روش مولکولی، ۴ جدایه (۴/۰۴ درصد) به‌عنوان استافیلوکوکوس ارئوس شناسایی شدند. ژن‌های مولد بیوفیلیم *icaA* و *clfB* 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 بیوفیلیم در سویه‌های استافیلوکوکوس ارئوس جداشده از شیرخام شهر تهران قابل توجه می‌باشد، لذا رعایت اصول بهداشتی به منظور کنترل و پیشگیری از ایجاد بیوفیلیم ضروری است.

واژه‌های کلیدی: ژن‌های مولد بیوفیلیم، 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 از جمله باکتری‌های بیماری‌زا در انسان به‌شمار می‌رود و یکی از رایج‌ترین عوامل 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 از جمله استافیلوکوکوس ارئوس به مصرف‌کنندگان دارد (Anonymous, 2011). عوامل حدت مختلف در بیماری‌زایی این باکتری نقش دارند یکی از مهم‌ترین فاکتورهای حدت در سویه‌های استافیلوکوکی تولید بیوفیلیم است (Otto, 2008). بیوفیلیم به گروهی از میکروارگانیسم‌ها اطلاق می‌شود که به یک سطح جامد و به‌همدیگر چسبیده‌اند و درون یک ماتریکس خارج سلولی پلیمری که خود تولیدکننده آن هستند محصورند (Kafil and Mobarez., 2015). توانایی تشکیل بیوفیلیم باعث ایجاد مقاومت این باکتری در برابر تنش‌های محیطی گردیده به‌گونه‌ای که سبب می‌شود پاک‌سازی مکانیکی و مواد ضد میکروبی 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).

بیوفیلیم‌ها 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 بیوفیلیم مستلزم وجود مجموعه ژن‌هایی (ica ADBC) است که با رمزگذاری آنزیم‌های دخیل در سنتز پلی‌ساکاریدهای چسبنده داخل سلولی صورت می‌گیرد. مطالعات مختلفی در ایران در خصوص توزیع ژن‌های مولد بیوفیلیم در باکتری استافیلوکوکوس ارئوس انجام گرفته است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ 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 بیوفیلیم 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 *icaD* و *icaA* 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

آزمون‌های بیوشیمیایی از جمله کاتالاز و کوآگولاز مورد ارزیابی قرار گرفتند. 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 برات (Merck, Germany) انتقال داده شد و ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. بعد از خروج از گرم‌خانه به خوبی یکنواخت گردید. به موازات آن به‌منظور کنترل منفی از آب‌عاری 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.

۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه به میکروتیوب ۲ سی‌سی منتقل و به‌مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰X g در سانتریفیوژ یخچال‌دار (sigma, Germany) با دمای ۴ 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 هم‌زده 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 ۴۰ میکرولیتر به هر نمونه افزوده و هم‌وزن گردید. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سلسیوس

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 از نقطه 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 و ۲۴ نمونه از شیرهای خام چهار کارخانه بزرگ شیر در شهر تهران تهیه گردید. نمونه‌ها از محل دریافت شیر به‌وسیله سرنگ ۵۰ میلی‌لیتری سترون به صورتی که دامداری‌ها تکراری نباشد در زمستان ۱۳۹۵ جمع‌آوری و در مجاورت یخ‌به 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 ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. سپس بر روی محیط کشت برد پارکر آگار (Merck, Germany) به همراه سوپانسیون زرده تخم‌مرغ همراه با تلوریت پتاسیم افزوده شده با استفاده از روش سطحی کشت داده شد و در ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۴۸ ساعت مجدداً گرمخانه‌گذاری گردید. پس از این مرحله پرگنه‌های سیاه رنگ با هاله شفاف به‌منظور انجام

قرار داده شد.

میکروتیوب به دست آمده است.

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 به مدت ۱ دقیقه در ۸۰۰۰X g سانتریفیوژ گردید. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از Inhibitor removal buffer به فیلتر تیوب افزوده و مجدداً به مدت ۱ دقیقه در ۳۰۰۰X g سانتریفیوژ گردید. در مرحله شستشو به هر فیلتر تیوب ۵۰۰ میکرولیتر بافر واش اضافه نموده و به مدت ۱ دقیقه در ۸۰۰۰X g سانتریفیوژ گردید و پس از آن فیلتر تیوب در یک کالکشن تیوب جدید قرار داده شد و به مدت ۱ دقیقه در ۸۰۰۰ X g سانتریفیوژ گردید تا عمل شستشو به طور کامل انجام پذیرد و به مدت ۱۵ ثانیه در ۸۰۰۰ X g قرار داده شد. فیلترتیوب را در میکروتیوب قرار داده و ۲۰۰ میکرولیتر محلول رهاسازی (Elution buffer) با دمای ۷۰ درجه سلسیوس اضافه گردید و به مدت ۱ دقیقه در ۸۰۰۰X g قرار داده شد. در این مرحله فیلتر تیوب را خارج نموده و ژن خالص شده در

#### - اندازه‌گیری غلظت و خلوص DNA

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

- آزمون PCR به منظور شناسایی ژن ترمونوکلئاز (*nuc*) و توزیع ژن‌های مولد بیوفیلیم

به منظور تشخیص تأییدی جدایه‌های مشکوک *استافیلوکوکوس آرئوس* از نظر تکثیر ژن ترمونوکلئاز و همچنین بررسی توزیع ژن‌های مولد بیوفیلیم 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 آرئوس* (ATCC33592) تهیه شده از مرکز ملی تشخیص‌های آزمایشگاهی سازمان دامپزشکی کشور به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

جدول (۱)- توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR به منظور بررسی توزیع ژن‌های مولد بیوفیلیم باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* جدا شده از شیر خام در شهر تهران

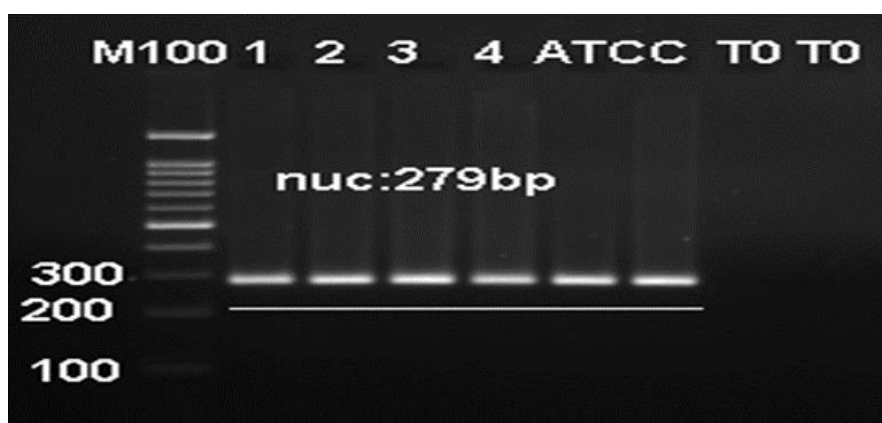
نام ژن	توالی پرایمر	دمای اتصال	اندازه محصول	منابع
<i>icaD</i>	5'-ATGGTCAAGCCAGACAGAG-3' 5'-AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA-3'	۵۵	۱۹۸	Rohde et al., 2001
<i>clfB</i>	5'-ACATCAGTAATAGTAGGGGCAAC-3' 5'-TTCGACTGTTTGTGTTTGCAC-3'	۵۵	۲۰۳	Tristan et al., 2003
<i>icaA</i>	5'-ACACTTGCTGGCGCAGTCAA-3' 5'-TCTGGAACCAACATCCAACA-3'	۵۵	۱۸۸	Rohde et al., 2001
<i>fnbA</i>	5'-CATAAATTGGGAGCAGCATCA-3' 5'-ATCAGCAGCTGAATCCCATT-3'	۵۵	۱۲۸	Vancraeynest et al., 2004
<i>nuc</i>	5'-GCGATTGATTGATGGTGATACGGTT-3' 5'-AGCCAAGCCTTGACGAACATAAAGC-3'	۵۵	۲۷۹	Brakstad et al., 1992

آزمون تأییدی مولکولی از نظر داشتن ژن ترمونوکلئاز اختصاصی گونه *استافیلوکوکوس ارئوس*، ۴ نمونه معادل ۴/۰۴ 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 نمونه های شیر خام ژن های *icaA*، *fnbA* و *clfB* با فراوانی (۱۰۰ درصد) مشاهده گردید و ژن *icaD* در یک سویه با فراوانی (۲۵ درصد) یافت شد. نتایج به دست 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 ۱/۹۱ می‌باشد. این میزان از خلوص بیانگر انجام دقیق کار و استخراج مناسب DNA می‌باشد.

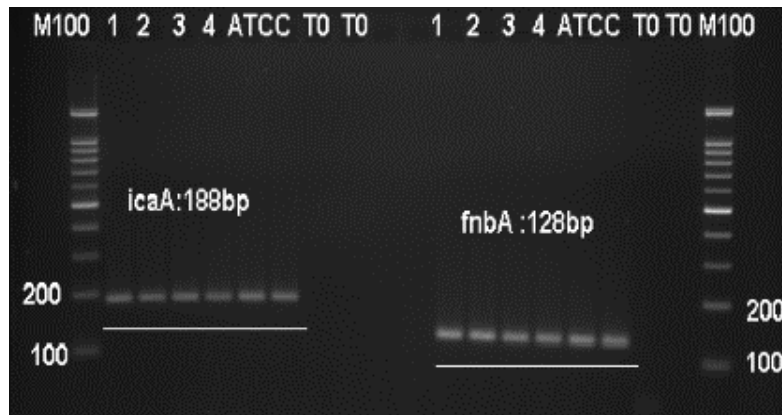
واکنش PCR برای ردیابی ژن‌های فوق در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase، ۲/۵ میکرولیتر بافر  $10\times$ ، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها، ۱ میکرولیتر dNTP، ۱ میلی مول  $MgCl_2$  و ۲ میکرولیتر DNA و ۱۶/۲۵ میکرولیتر D.W. الگو و با برنامه حرارتی ۱ سیکل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه، ۵۳ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه و یک سیکل نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت 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 به مدت ۷۰ دقیقه انجام گرفت. ژل مورد نظر با دستگاه ترانس لومیناتور UV مورد بررسی قرار گرفت.

### یافته‌ها

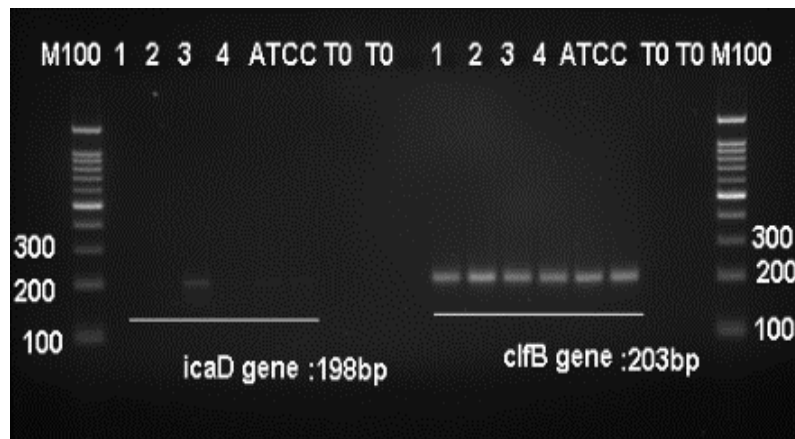
از مجموع ۹۹ نمونه شیر خام جمع‌آوری شده بر اساس روش کشت، آزمون‌های بیوشیمیایی و انجام



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 ۴-۱ ایزوله‌های مثبت، ستون ۵ و ۶ 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 ارتوس در شیر خام تهران. ستون ۱: نشان‌گر DNA، ستون ۴-۱ ایزوله‌های مثبت، ستون ۵ و ۶ کنترل مثبت / استافیلوکوکوس ارتوس ATCC33592، ستون ۷ و ۸ کنترل منفی



شکل (۳) - ژل الکتروفورز محصول PCR مربوط به شناسایی ژن *icaD* و *clfB* در باکتری استافیلوکوکوس ارتوس در شیر خام تهران. ستون ۱: نشان‌گر DNA، ستون ۴-۱ ایزوله‌های مثبت، ستون ۵ و ۶ کنترل مثبت / استافیلوکوکوس ارتوس ATCC33592، ستون ۷ و ۸ کنترل منفی

عوامل ایجاد عفونت‌های پستان‌ها 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

## بحث و نتیجه‌گیری

استافیلوکوک‌ها 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

نشان داده شد که ۷۸/۲۶ 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 ۳۵ 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 ۱۵ جدایه از ۵۹ جدایه *استافیلوکوکوس ارئوس* 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 (Ciftci et al., 2009). با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر در شهر تهران ۲۵ درصد نمونه‌ها هر دو ژن مورد نظر را هم‌زمان داشته‌اند که با نتیجه مطالعه حاضر تطابق دارد. در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۶ در برزیل از مجموع ۱۱۲ *استافیلوکوکوس ارئوس* به دست آمده از گاوهای ورم پستانی فراوانی ژن‌های *icaA* و *icaD* ۸۶/۶ درصد و فراوانی ژن‌های *clfA* و *fnbA* و *bap* به ترتیب ۷۰، ۷۷/۷ و ۱۳/۴ 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 ۳۶ 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 هم‌خوانی داشته است (Grinholc et al., 2007).

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 فرآورده‌های آن تکثیر پیدا کرده و منجر به بیماری‌زایی در انسان گردد و از سوی دیگر می‌تواند از طریق تولید بیوفیلیم نقش مهمی در ایجاد بیماری مزمن ورم پستان گاو داشته باشد (Aarnisalo et al., 2007).

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد شیوع آلودگی شیر خام در شهر تهران به باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* ۴/۰۴ 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 سنج در سال ۲۰۱۴ بر روی ۱۲۰ نمونه شیر خام انجام گرفت ۴۹ نمونه (۴۰/۸۳ درصد) از نقطه نظر آلودگی به *استافیلوکوکوس ارئوس* مثبت گزارش شده است. در این مطالعه فراوانی هر یک از ژن‌های عامل حداث مولد بیوفیلیم شامل *icaD*، *clfB*، *fnbA* و *icaA* به ترتیب (۶۹/۳۸ درصد)، *fnbA* (۳۲/۶ درصد)، *clfaB* (۳۸/۷۷ درصد) و *icaD* (۵۹/۱۸ درصد) گزارش شد (Shojaei et al., 2014). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ 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 (Saleh 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

مناطق جغرافیایی مختلف، محل نمونه برداری، خصوصیات ژنتیکی ایزوله‌ها، شرایط و نحوه انجام آزمایش، و وضعیت بهداشتی محل جمع‌آوری نمونه‌ها و استفاده از ضد عفونی کننده‌ها با شد. هم‌چنین در برخی مطالعات رابطه معکوس بین حضور ژن *bap* و ژن‌های *icaA* و *icaD* در باکتری استافیلوکوکوس ارتوس 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 پلی‌مرز (PCR) برای شناسایی ژن‌های چندگانه بیوفیلیم حاصل از باکتری استافیلوکوکوس ارتوس 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 منافی برای اعلام ندارند.

پژوهش سال ۲۰۱۲ در برزیل ۸۵ سویه استافیلوکوکوس ارتوس 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 ارتوس در ایجاد عفونت ممکن است به دلیل بیان متفاوت فاکتورهای حدت در ایزوله‌های مختلف باشد (Raphael *et al.*, 2012).

میزان شیوع پایین آلودگی شیر خام تهران نسبت به سایر مناطق می‌تواند به دلیل رعایت اصول بهداشت در دامداری‌ها، سطح بالای سلامت دام‌ها، کنترل به موقع بیماری‌های دام، تمیز بودن ظروف جمع‌آوری شیر خام، رعایت مناسب بهداشت فردی کارکنان دامداری‌ها، شرایط مناسب حمل و نقل و انجام صحیح نمونه برداری و آزمایش باشد. در خصوص توزیع ژن‌های مولد بیوفیلیم نتایج مطالعه حاضر با برخی از مطالعات هم‌خوانی داشته و با برخی دیگر هم سو نباشد. به‌طور کلی می‌توان اظهار داشت ژنوتیپ مختلف به دست آمده از ژن‌های مولد بیوفیلیم در پژوهش‌های انجام شده ممکن است به دلیل خواستگاه‌های مختلف باکتری،

### 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 methicillin 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 from bovine mastitis based on polymorphism of the coagulase gene in the north west of Iran. *Veterinary Microbiology*, 137: 202–206.
- Dhanawade N.B. D.R. Kalorey, R. Srinivasan, S.B. Barbuddhe and N.V. Kurkure (2010). Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Veterinary Research Communication*, 34: 81–89.
- Eftekhari F. 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. 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, PJ. Farland, AM. Knovich, MA. Batt, KM 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, DA. *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. 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. 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. Tahmourespour, A. 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. 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. 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. 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. 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.<sup>1,3</sup> Shakerian, A.<sup>2,3\*</sup>, Rahimi, E.<sup>2,3</sup>, Salehzadeh, F.<sup>4</sup>

1. M.Sc Graduate of Veterinary Medicine, 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
3. Research Center of Nutrition and Organic Products (RCNOP), Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
4. The Iran Veterinary Organization (IVO)

\*Corresponding author's: Amshakerian@yahoo.com  
(Received: 2017/9/6 Accepted: 2017/11/21)

### Abstract

*Staphylococcus aureus* is one of the most important virulence factors in milk and dairy products that may cause of several disease in human. Several virulence factors are involved in its ability to cause disease that one of the most important of them is the ability of the bacterium to produce biofilm. These bacteria are capable of producing polysaccharides and proteinaceous substances attached to the surfaces that leads to biofilm formation. In this study to assess the presence of *S.aureus* and distribution of genes encoding biofilm formation in the raw milk from Tehran city, a total of 99 raw milk samples was obtained from 4 big milk plants in the sterile conditions and assessed by conventional microbiological culturing methods and confirmed by PCR assayed. For this, 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 of microbiological culturing and after confirming them with molecular ways, 4 isolates were detected as *s.aureus* (4.04%). The genes encoding biofilm formation, *fnbA*, *cltB*, & *icaD* were identified in all 4 isolates (100 %) and only one isolate (25%) contained *icaD* gene. Because the frequency of biofilm encoding genes separated from raw milk samples of Tehran city is considerable implementing hygienic principles is essential to control and preventing biofilm formation.

**Conflict of interest:** None declared.

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