

فراوانی بالای ژن‌های مرتبط با تولید بیوفیلیم (*icaA*، *fnbA*، *icaD* و *clfA*) در ایزوله‌های استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده از گاوهای مبتلا به التهاب پستان

فریبا منصوری^۱، سید سجاد خرم روز^{۲*}، یاسر محمودی موردراز^۳، مسعود مرعشی فرد^۴، سید علی اصغر ملک‌حسینی^۳

گروه علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یاسوج، یاسوج، ایران، ^۲مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، آکمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۱۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به اهمیت کلونیزاسیون *استافیلوکوکوس ارئوس* در التهاب پستان گاو و نقش بیوفیلیم در روند بیماری‌زایی، هدف از این مطالعه تعیین و بررسی فنوتیپی تولید بیوفیلیم و متعاقب آن شناسایی ژن‌های مرتبط با تولید بیوفیلیم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از پستان از گاوهای مبتلا به التهاب پستان بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - تحلیلی، ۵۰۲ نمونه از شیر گاوهای مبتلا به التهاب پستان تحت بالینی، از دامداری‌های شهرستان بویراحمد و دنا جمع‌آوری گردید. پس از جداسازی اولیه باکتری‌ها، از روش PCR و با بررسی وجود ژن *nucA* به تأیید نهایی *استافیلوکوکوس ارئوس* اقدام شد. بررسی فنوتیپی بیوفیلیم به روش کنگورد آگارپلیت صورت گرفت. جهت شناسایی و تکثیر ژن‌های مرتبط با بیوفیلیم (*icaA*، *icaD*، *fnbA*، *clfA*، *cna* و *bap*) از روش مولکولی PCR استفاده شد. داده‌ها با استفاده از روش‌های آماری توصیفی و آزمون آماری مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در مجموع ۸۰ (۱۵/۹ درصد) ایزوله *استافیلوکوکوس ارئوس* جداسازی شد، که از میان آنها ۵۵ (۶۸/۷ درصد) ایزوله توانایی تشکیل بیوفیلیم را داشتند. بالاترین فراوانی مربوط به ژن *icaD* در ۸۷/۵ درصد ایزوله‌ها و ژن *bap* با کمترین فراوانی در ۴ ایزوله (۵ درصد) شناسایی شد. تولید بیوفیلیم به وسیله باکتری‌ها با حضور ژن‌های *icaD* ($p=0/0001$)، *icaA* ($p=0/003$)، *fnbA* ($p=0/0001$) و *clfA* ($p=0/0001$) از نظر آماری ارتباط معنی‌دار داشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به اهمیت بیوفیلیم در مقاومت آنتی‌بیوتیکی و همچنین فراوانی بالای تشکیل بیوفیلیم در سویه‌های جدا شده به عنوان زنگ خطر محسوب می‌شود، از این رو تشکیل بیوفیلیم با کمک به افزایش توان استقرار و بیماری‌زایی باکتری می‌تواند آسیب‌های بهداشتی و اقتصادی زیادی را بر جامعه تحمیل کند.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس ارئوس*، بیوفیلیم، ژن‌های مرتبط با تولید بیوفیلیم، التهاب پستان

* نویسنده مسئول: سید سجاد خرم روز، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

Email: khoramrooz@gmail.com

مقدمه

نقش بیوفیلیم برای باکتری، اتصال باکتری به سطوح مختلف، کسب مواد غذایی و حفاظت از ارگانسیم در برابر استرس‌های محیطی و ترکیبات ضد میکروبی است (۱). بیوفیلیم ساختاری پلی‌مریک است که اجتماعی از سلول‌ها در اطراف خود ایجاد می‌کنند و از طریق آن به سطوح زنده و غیرزنده متصل می‌شوند. بیوفیلیم به باکتری اجازه می‌دهد که به صورت حفاظت شده‌ای در درون محیط میزبانی رشد کرده و زنده بماند (۴). اولین مرحله در ایجاد عفونت پستان، اتصال باکتری به سلول‌های اپیتلیال پستان است که بیوفیلیم تشکیل شده به وسیله باکتری نقش مهمی در این رابطه بازی می‌کند و موجب اتصال به سطح سلول اپیتلیال و کلونیزاسیون باکتری می‌گردد (۵).

ادهسین داخل سلولی (PIA) در سویه‌های استافیلوکوکوس ارئوس به وسیله قطعه ژنی *ica* (۲) که حاوی چهار ژن *icaA*، *icaB*، *icaC* و *icaD* می‌باشد، کد می‌شود. ژن *icaA* کد کننده آنزیم N-استیل گلوکز آمینیل ترانسفراز سنتز کننده ادهسین‌های پلی‌ساکاریدی خارج سلولی است و *icaD* نقش مهمی در بیان این آنزیم بازی می‌کند. بیان هم‌زمان و همراه این دو ژن برای تولید حداکثری بیوفیلیم در استافیلوکوکوس نیاز است. ژن‌های *icaA* و *icaD* با شیوع فراوانی در سویه‌های استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده از التهاب پستان یافت می‌شوند و این یافته نشان می‌دهد که قطعه *ica* دارای نقش اساسی به

التهاب پستان (۱) گاو که به وسیله میکروارگانسیم‌های مختلفی ایجاد می‌شود، می‌تواند تأثیر اقتصادی بسزایی بر روی صنایع لبنی بگذارد. این بیماری به صورت التهاب در غده پستانی تعریف می‌شود و اغلب به وسیله عفونت‌های درون پستانی باکتریایی ایجاد می‌شود. در میان پاتوژن‌های بالقوه برای ایجاد این بیماری، جنس استافیلوکوکوس شایع‌ترین باکتری جدا شده می‌باشد (۱). استافیلوکوکوس ارئوس یک باکتری بیماری‌زا برای محدوده گسترده‌ای از سلول‌های یوکاریوتی از قبیل سلول‌های اپیتلیال غدد پستانی و سلول‌های ایمنی است (۲). استافیلوکوک‌ها قادر به ایجاد و گسترش سریع و پایدار عفونت در غده پستانی می‌باشند که اغلب به شکل التهاب پستان تحت بالینی بروز می‌یابد و قابل تشخیص نمی‌باشد. استافیلوکوکوس ارئوس به عنوان پاتوژن مشترک بین انسان و گونه‌های مختلف دام از عوامل اصلی در ایجاد عفونت‌های التهاب پستان در گاو می‌باشد (۳ و ۱). سویه‌های استافیلوکوکوس ارئوس می‌توانند موجب ایجاد فرم‌های حاد (معمولاً بالینی) و مزمن (معمولاً تحت بالینی) التهاب پستان گردند. فرم تحت بالینی موجب مشکلات اقتصادی مهمی برای تولید کنندگان محصولات لبنی، کاهش در میزان و کیفیت شیر و درمان‌های آنتی‌بیوتیکی پرهزینه می‌گردد (۲). این باکتری قادر به تشکیل یک کمپلکس چندسلولی به نام بیوفیلیم است که به عنوان یک فاکتور ویروانس برای باکتری به شمار می‌رود.

1- Mastitis
2- Locus

CifB می‌باشند که با اتصال به فیبرینوزن موجب تجمع پلاکت‌ها می‌شوند. هم‌چنین پروتئین متصل شونده به کلاژن (Cna) واسطه اتصال استافیلوکوکوس ارئوس به کلاژن میزبان است و این اتصال می‌تواند به تهاجم باکتری به بافت‌های مختلف کمک کند (۷).

روش‌های فنوتیپی متعددی برای شناسایی بیوفیلم در ایزوله‌های استافیلوکوکوس ارئوس به کار رفته است، از جمله روش لوله ای استاندارد، روش کریستنسین، روش کنگورد آگار و روش میکرودایلوشن که برای بررسی فنوتیپی تولید لایه لعابی در استافیلوکوکوس ارئوس مورد استفاده قرار می‌گیرد. تست کنگورد آگار پلیت یک تست ساده، سریع، حساس و تکرارپذیر است که در آن کلونی‌های باکتری قابل مشاهده بوده و نسبت به تست لوله‌ای استاندارد اختصاصی‌تر است (۸). با توجه به اهمیت کلونیزاسیون استافیلوکوکوس ارئوس در التهاب پستان و نقش بیوفیلم در روند بیماری‌زایی و کمک به استقرار باکتری‌ها در بافت پستان و هم‌چنین متعاقب آن افت تولید شیر و ضررهای اقتصادی ناشی از این عفونت‌ها، هدف از این مطالعه تعیین و بررسی فنوتیپی تولید بیوفیلم و متعاقب آن شناسایی ژن‌های مرتبط با تولید بیوفیلم در ایزوله‌های استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده پستان از گاوهای مبتلا به التهاب پستان بود.

روش بررسی

1-Microbial surface recognizing adhesivematrix molecules(MSCRAMMs)

عنوان فاکتور ویروالانس در روند بیماری‌زایی التهاب پستان در نشخوارکنندگان می‌باشد (۵). برخی پروتئین‌ها نیز در تشکیل بیوفیلم نقش دارند که از آن جمله می‌توان پروتئین Bap کد شده به وسیله ژن bap را نام برد. پروتئین Bap نه تنها در مرحله اتصال اولیه نقش دارد بلکه به همراه ادهسین‌های پلی‌ساکاریدی درون سلولی (PIA) در تجمع و اتصال سلول به سلول و بلوغ بیوفیلم نقش ایفا می‌کند. پژوهش‌ها نشان داده است که سویه‌های استافیلوکوک حامل ژن bap حتی در غیاب اپرون icaADBC نیز بیوفیلم محکمی تولید می‌کنند (۴). علاوه بر ادهسین‌های پلی‌ساکاریدی درون سلولی و پروتئین Bap، ادهسین‌های سطحی Spa، FnBPA، FnBPB و SasG در تشکیل بیوفیلم به وسیله استافیلوکوکوس ارئوس دخالت دارند (۶). استافیلوکوکوس ارئوس یک سری مولکول‌های ماتریکس چسبنده شناسایی کننده سطح میکروبی (۱) نیز تولید می‌کند که می‌تواند در اتصال به سلول میزبان مؤثر باشند. از جمله این فاکتورها می‌توان دو پروتئین متصل شونده به فیبرو نکتین به نام‌های FnBPA و FnBPB را نام برد که قادر هستند به فیبرونکتین و الاستین متصل گردند، در عین حال FnBPA قادر است به فیبرینوزن نیز متصل شود. FnBPها فیبرونکتین را به سطح سلول باکتریایی متصل می‌کنند و این ساختار موجب اتصال باکتری به اینتگرین‌های میزبان می‌شود. FnBPA و FnBPB نقش مهمی در کلونیزاسیون باکتری در سلول میزبان دارند. از دیگر ادهسین‌ها، فاکتورهای توده‌ای کننده CifA و

تهیه شد و سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مورد نظر به صورت نقطه‌ای به محیط کشت تلقیح شد. در نهایت، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، بر اساس رنگ ایجاد شده به وسیله کلنی‌ها، الگوی بیوفیلیم ثبت و بررسی شد. کلنی‌های قرمز نشان دهنده عدم تشکیل بیوفیلیم و کلنی قهوه‌ای و سیاه نشان دهنده تشکیل بیوفیلیم به وسیله ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* بود.

به منظور شناسایی ژن‌های تشکیل دهنده بیوفیلیم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* ابتدا استخراج DNA به روش جوشاندن^(۳) انجام شد. بدین منظور ابتدا یک کلنی از باکتری خالص و تازه در تیوب‌های استریل حاوی ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل حل شد و با دستگاه ورتکس هموژنیزه گردید. سپس تیوب‌های حاوی باکتری به مدت ۱۰ دقیقه درون حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به صورت شناور در راک‌های مخصوص قرار داده شد. پس از آن، تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ گردید و در نهایت، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی که حاوی ژنوم بود به عنوان DNA باکتری به میکروتیوب‌های ۰/۵ سی‌سی انتقال داده شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت شناسایی و تکثیر ژن‌های تشکیل

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، ۵۰۲ نمونه از شیر گاوهای مبتلا به التهاب پستان تحت بالینی، از دامداری‌های شهرستان بویراحمد و دنا جمع‌آوری گردید. جداسازی اولیه باکتری‌ها بر روی محیط کشت مانیتول سالت آگار و بلاد آگار صورت گرفت. گاوهای مبتلا به التهاب پستان که تحت درمان آنتی‌بیوتیکی بودند، از مطالعه حذف شدند. کلنی‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس ارئوس* با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی از جمله؛ کاتالاز، کوگولاز لوله‌ای، تخمیر قند مانیتول، DNase شناسایی شدند. در نهایت با روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و با بررسی وجود ژن‌های *nucA* به شناسایی *استافیلوکوکوس ارئوس* اقدام شد (۹ و ۱۰).

بررسی فنوتیپی بیوفیلیم بر روی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* به روش کنگورد آگارپلیت^(۱) صورت گرفت. برای تهیه محیط کنگورد آگار میزان ۰/۸ گرم رنگ کنگورد (سیگما-آلمان)، ۱۵ گرم کلرید سدیم و ۳۶ گرم ساکاروز (سیگما-آلمان) به یک لیتر از محیط BHI Agar اضافه شد. بعد از اتمام فرآیند استریلیزاسیون به وسیله اتوکلاو و رسیدن دمای محیط BHI به ۵۰ درجه سانتی‌گراد، گلوکز به نسبت ۲ درصد و آنتی‌بیوتیک و نکومایسین با غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به محیط اضافه گردید (۱۱). برای انجام بررسی فنوتیپی تولید بیوفیلیم، از کشت شبانه *استافیلوکوکوس ارئوس* بر روی محیط نوترینت آگار^(۲)، سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند

1-Congo Red Agar Plate
2-Nutrient Agar
3-Boiling

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر ۵۰۲ نمونه شیر از دامداری‌های ۸ منطقه در شهرستان بویراحمد و دنا که با کدهای A تا H مشخص شدند، جمع‌آوری گردید، که بیشترین نمونه شیر (۲۰۵ نمونه) از دامداری صنعتی منطقه A و کمترین نمونه (۱۳ نمونه) از دامداری صنعتی منطقه H گرفته شد. در مجموع (۱۵/۹ درصد) ۸۰ ایزوله / استافیلوکوکوس ارئوس از نمونه‌های شیر جداسازی شد که بیشترین ایزوله‌های استافیلوکوکوس ارئوس (۳۴ ایزوله) از نمونه‌های شیر گرفته شده از منطقه B جداسازی گردید و در نمونه‌های گرفته شده از منطقه F باکتری مورد نظر جداسازی نشد. در این مطالعه بیشترین درصد آلودگی مربوط به دامداری نیمه صنعتی منطقه E (۲۶/۹۲ درصد) و کمترین میزان آلودگی مربوط به منطقه F بود که هیچ‌گونه آلودگی وجود نداشت (جدول ۲).

ایزوله‌های جدا شده به جهت تولید بیوفیلم به روش کنگورد آگارپلیت مورد بررسی قرار گرفتند که ۶۸/۷ درصد از مجموع ایزوله‌ها توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند. باکتری‌های جدا شده از منطقه G (۴/۴) به صورت ۱۰۰ درصد تولید کننده بیوفیلم بودند و ایزوله‌های جدا شده از منطقه H و D فاقد قدرت تولید

دهنده بیوفیلم یعنی *icaA*، *icaD*، *fnbA*، *clfA* و *cna* و *bap* از پرایمرهای ذکر شده در جدول ۱ استفاده شد.

برای انجام واکنش PCR به صورت تکی، جهت ژن‌های تشکیل دهنده بیوفیلم در حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل؛ ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (آمپلیکون دانمارک)، ۱ میکرولیتر پرایمر Forward، ۱ میکرولیتر پرایمر Reverse و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل و ۵ میکرولیتر DNA مکمل، انجام شد. شرایط دمایی مورد نیاز برای تکثیر ژن‌ها در واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Biorad T100 USA شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون ثانویه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمر ۴۹ درجه سانتی‌گراد برای ژن‌های *icaA* و *icaD*، ۵۲ برای ژن *fnbA*، ۵۴ درجه سانتی‌گراد برای *cna* و ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ژن‌های *bap* و *clfA* به مدت ۴۰ ثانیه و دمای امپلیفیکاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت پس از پایان سیکل‌ها، تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه انجام شد. بعد از پایان واکنش، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد ران و الکتروفورز گردید و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. با استفاده از دستگاه ژل داکيومنت (میجرس-اینس تایوان) عکس‌برداری، مشاهده و بررسی باندها انجام گرفت.

جدول ۳: درصد تولید بیوفیلیم در ایزوله‌های جدا شده از مناطق مورد مطالعه

منطقه	تعداد باکتری جدا شده	تعداد باکتری مولد بیوفیلیم	درصد تولید بیوفیلیم
G	۴	۴	۱۰۰
B	۳۴	۳۱	۹۱/۱۷
C	۸	۷	۸۷/۵
E	۷	۶	۸۵/۷
A	۲۴	۷	۲۹/۱۶
D	۲	۰	۰
H	۱	۰	۰



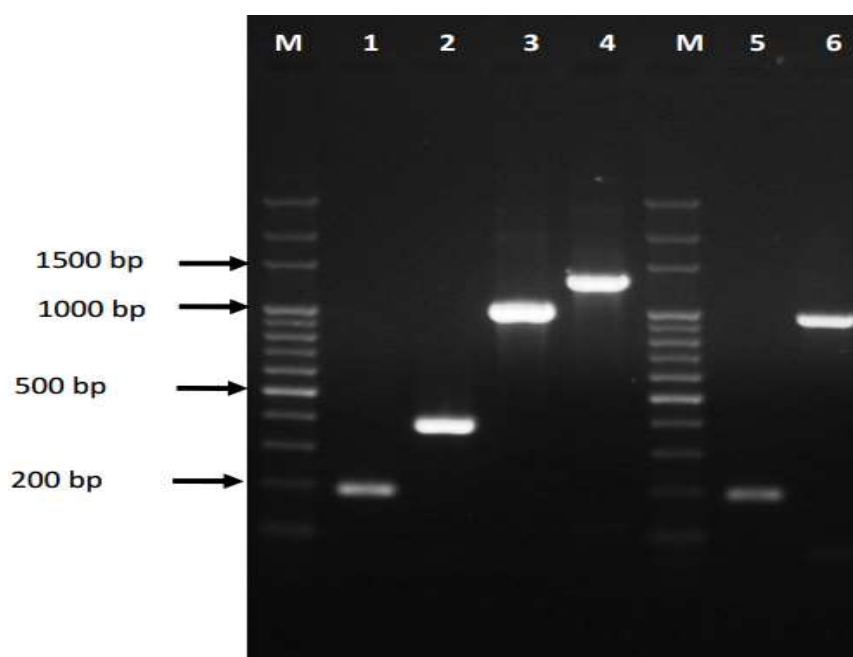
تصویر ۱: بررسی فنوتیپی بیوفیلیم در ایزوله‌های استافیلوکوکوس ارتوس: a: کلنی‌های بی‌رنگ نشان دهنده عدم تشکیل بیوفیلیم، b: رنگ قهوه‌ای تولید بیوفیلیم متوسط و c: کلونی‌های سیاه نشان دهنده تشکیل بیوفیلیم قوی

جدول ۴: فراوانی ژن‌های تشکیل دهنده بیوفیلیم به تفکیک دامداری‌های مورد بررسی بر اساس درصد

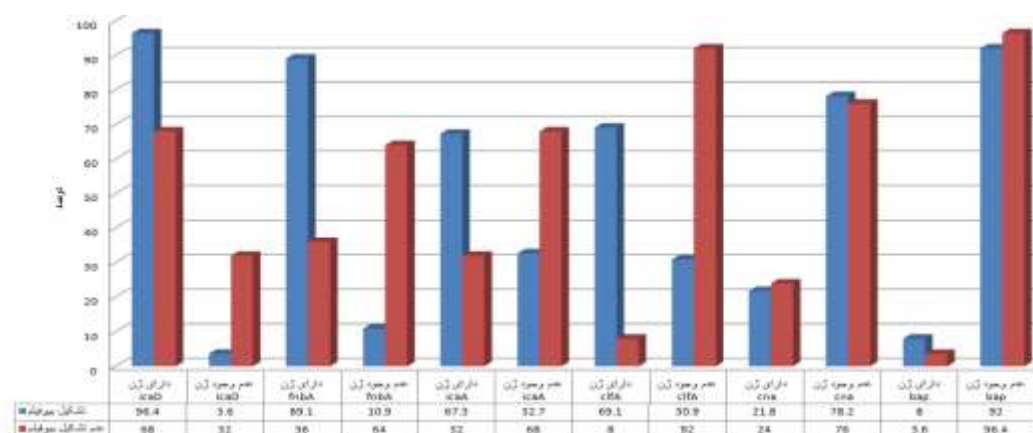
ژن منطقه	Bap	Cna	clfA	icaA	fnbA	icaD
A	۸/۲۳	۱۶/۶۶	۲۵	۴۱/۶۶	۴۵/۸۳	۷۹/۱۶
B	۲/۹۴	۲۲/۵۲	۷۳/۵۲	۶۱/۷۶	۸۲/۳۵	۹۴/۱۱
C	۰	۲۵	۲۵	۶۲/۵	۷۵	۷۵
D	۰	۰	۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
E	۰	۲۸/۵۷	۵۷/۱۴	۵۷/۱۴	۸۵/۷۱	۸۵/۷۱
G	۰	۲۵	۵۰	۵۰	۱۰۰	۱۰۰
H	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

جدول ۵: توزیع فراوانی ژن‌های تشکیل دهنده بیوفیلم در ۸۰ ایزوله استافیلوکوکوس ارئوس

ردیف	نام ژن	فراوانی نسبی	درصد ژن
۱	icaD	۷۰	۸۷/۵
۲	fnbA	۵۸	۷۲/۵
۳	icaA	۴۵	۵۶/۲۵
۴	clfA	۴۰	۵۰
۵	cna	۱۸	۲۲/۵
۶	bap	۴	۵



تصویر ۲: محصولات واکنش PCR مربوط به ژن‌های تشکیل دهنده بیوفیلم در استافیلوکوکوس ارئوس، M نشان دهنده وزن مولکولی DNA، شماره ۱ ژن cna با وزن ۱۹۲ جفت‌باز، شماره ۲ ژن icaD با ۲۸۱ جفت‌باز، شماره ۳ ژن clfA با ۱۰۰۰ جفت‌باز، شماره ۴ ژن icaA با ۱۳۱۵ جفت‌باز، شماره ۵ ژن fnbA با ۱۹۱ جفت‌باز و شماره ۶ ژن bap با ۹۷۱ جفت‌باز نشان دهنده حضور هر یک از ژن‌ها در ایزوله‌های استافیلوکوکوس ارئوس می‌باشد



نمودار ۱: فراوانی تولید بیوفیلم و عدم تولید بیوفیلم در ایزوله‌های دارای ژن و فاقد ژن‌های تشکیل دهنده بیوفیلم از نظر ارتباط معنی‌داری

بحث

در مطالعه حاضر ۸۰ نمونه به عنوان *استافیلوکوکوس ارئوس* جداسازی شد و سپس با روش کنگورد آگار پلیت توانایی فنوتیپی ایزوله‌ها در تشکیل بیوفیلم بررسی گردید که ۶۸/۷۵ درصد ایزوله‌ها تولید کننده بیوفیلم بودند. از نظر توانایی فنوتیپی ایزوله‌ها در تشکیل بیوفیلم، نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با نتایج پژوهش‌های انجام شده به وسیله واسودوان و همکاران بر روی ۳۵ گونه *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از گاوهای مبتلا به التهاب (۶۸ درصد) (۱۴) و مطالعه یوریو و همکاران بر روی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از خون (۶۲/۵ درصد) (۱۶) مشابهت داشت.

فراوانی نسبی تولید بیوفیلم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از گاوهای مبتلا به التهاب پستان در مطالعه حاضر در مقایسه با نتایج پژوهش‌هایی که به وسیله پولیانان و همکاران (۸۵ درصد) (۱۷)، گاد و همکاران (۸۳ درصد) (۱۸) کمتر بود، ولی از نتایج گزارش شده به وسیله چاوهان و همکاران (۵۸ درصد) (۱۲)، سیفت سی و همکاران (۳۷/۲ درصد) (۵)، اولیویرا و همکاران (۳۷/۵ درصد) (۱۵)، باسلگا و همکاران (۱۲ درصد) بیشتر بود (۱۹). این تفاوت می‌تواند به دلیل شرایط محیطی متفاوت و حضور ژن‌های فرعی باشد که می‌توانند بر روی رفتار فنوتیپی باکتری در محیط کشت کنگورد آگار مؤثر باشند (۵).

ایمان عینی و همکاران با مطالعه ۱۷ نمونه *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از کودکان مبتلا به

با توجه به اهمیت کلونیزاسیون *استافیلوکوکوس ارئوس* در التهاب پستان و نقش بیوفیلم در روند بیماری‌زایی و کمک به استقرار باکتری‌ها در بافت پستان و همچنین متعاقب آن افت تولید شیر و ضررهای اقتصادی ناشی از این عفونت‌ها، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی فراوانی ژن‌های مرتبط با تولید بیوفیلم (*icaA, fnbA, icaD* و *clfA*) در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از گاوهای مبتلا به التهاب پستان بود.

استافیلوکوکوس ارئوس از مهم‌ترین عوامل التهاب غدد پستانی در گاو می‌باشد که از پرهزینه‌ترین بیماری‌ها در تولید لبنیات بوده و ضررهای اقتصادی زیادی به صنعت گاوهای شیری وارد می‌سازد (۱۳ و ۱۲). بیماری‌زایی *استافیلوکوکوس ارئوس* با فاکتورهایی از قبیل: توکسین، آدهسین‌های خارج سلولی، تشکیل بیوفیلم و مقاومت به فاگوسیتوز مرتبط است. توانایی تشکیل بیوفیلم به وسیله *استافیلوکوکوس ارئوس* به باکتری کمک می‌کند که در شرایط محیطی بدن میزبان زنده مانده و موجب مزمن و پایدار شدن عفونت حاصل از آن در بدن میزبان می‌گردد (۱۴). در مورد سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* عامل بیماری التهاب پستان نیز، تولید بیوفیلم به عنوان یک فاکتور برای استقرار باکتری در غدد پستانی محسوب می‌گردد (۱۵).

icaD ۵۶/۱۱ درصد، ژن cna ۳۴/۱۱ درصد، ژن fnbA ۵۶/۱ درصد گزارش شد و ژن clfA در هیچ‌کدام از ایزوله‌ها وجود نداشت (۲۱) که نتایج حاصل از این پژوهش‌ها از نظر فراوانی ژن‌های fnbA و bap با مطالعه آندو و از نظر فراوانی ژن icaA با مطالعه انجام گرفته به وسیله کاریما مطابقت داشت.

مطالعه آرشیولا و همکاران نشان داد که تغییر فتوتیپی ممکن است با عدم وجود ژن‌های icaA و icaD و یا حذف کامل لوکوس ica در ارتباط باشد (۲۵). از طرفی کرامتون و همکاران طی مطالعه‌ای مشاهده کردند که گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از گاوهای مبتلا به التهاب پستان علی‌رغم داشتن جایگاه ica نتوانستند در شرایط آزمایشگاهی بیوفیلیم تشکیل دهند (۲۶). بررسی و مقایسه نتایج تولید بیوفیلیم و فراوانی ژن‌های تشکیل دهنده بیوفیلیم در مطالعه حاضر و سایر پژوهش‌ها نتایج متغیری را نشان داد. علت این تفاوت را می‌توان به مواردی نظیر منبع جداسازی باکتری، منطقه جغرافیای متفاوت، pH محیط، دما و دیگر فاکتورهای محیطی مؤثر بر تشکیل بیوفیلیم نسبت داد (۲۷). برخی پژوهش‌های انجام شده نشان داده‌اند که حتی در صورت وجود لوکوس ica در باکتری، به دلیل حساسیت بسیار بالای باکتری به شرایط محیطی، تشکیل بیوفیلیم به وسیله باکتری با شکست مواجه شده است. در عین حال، شکست در تشکیل بیوفیلیم به وسیله *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند به دلایل حذف لوکوس ica از باکتری و یا بروز جهش نقطه‌ای در این لوکوس یا دیگر فاکتورهایی که

هایپرتروفی آدنوئید جهت بررسی تولید بیوفیلیم دریافتند که ۱۰۰ درصد نمونه‌ها تولید بیوفیلیم داشتند و میزان تشکیل بیوفیلیم بیشتر از مطالعه حاضر بود (۲۰). همچنین کاریما و همکاران به این نتیجه رسیدند که ۵۱/۲ درصد نمونه‌های جدا شده از بینی کودکان تولید کننده بیوفیلیم هستند (۲۱).

همچنین نتایج حاصل از روش مولکولی PCR در پژوهش حاضر نشان داد که درصد ژن‌های تشکیل دهنده بیوفیلیم icaD، fnbA، icaA، clfA، cna و bap به ترتیب: ۸۷/۵، ۷۲/۵، ۵۶/۲۵، ۵۰، ۲۲/۵ و ۵ درصد بوده است. خرمیان طوسی و همکاران در مطالعه خود بر روی *استافیلوکوکوس‌های* جدا شده از شیر گاو، فراوانی ژن‌های icaA و icaD را ۷۸/۷ درصد گزارش کردند (۲۲). آندو و همکاران با مطالعه *استافیلوکوکوس‌های* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از عفونت‌های ادراری درصد ژن‌های fnbA و bap را به ترتیب ۷۲/۵ و ۵/۵ درصد گزارش کردند (۲۳). در مطالعه سیفت‌سی و همکاران بر روی ۵۹ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از گاوهای مبتلا به التهاب پستان، ۲۷/۱ درصد از ایزوله‌ها دارای ژن icaA ۶۴/۴ درصد از ایزوله‌ها دارای ژن icaD و ۲۵/۴ درصد از مجموع ایزوله‌ها دارای هر دو ژن icaA و icaD بودند (۵). سماح و همکاران با *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* جدا شده از گاوهای مبتلا به التهاب پستان، فراوانی ژن icaD را ۶۲/۵ درصد، ژن icaA را ۱۵ درصد و ژن bap را ۲۵ درصد گزارش کردند (۲۴). در مطالعه کاریما و همکاران فراوانی ژن‌های icaA و

زنگ خطر محسوب می‌شود چرا که مصرف بالای محصولات لبنی به وسیله مردم و از طرف دیگر مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی ناشی از تولید بیوفیلیم در *استافیلوکوکوس اورئوس* که توان بیماری‌زایی آن را افزایش می‌دهد، می‌تواند آسیب‌های بهداشتی و اقتصادی زیادی را بر جامعه تحمیل کند.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشجوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج رشته میکروبیولوژی می‌باشد. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مسئولین محترم آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی و مدیران و کارکنان دامداری‌های مناطق مختلف که در تمامی مراحل اجرای این پروژه همکاری نمودند تشکر نمایند.

موجب تنظیم منفی تولید PIA و تأثیر بر تولید بیوفیلیم می‌گردند، باشد. علاوه بر این بیان فنوتیپی تشکیل بیوفیلیم با استفاده از روش کنگورد آگار پلیت (CRA) به شرایط آزمایشگاه بسیار حساس است و به همین دلیل توصیه می‌شود که برای شناسایی و جداسازی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تشکیل دهنده بیوفیلیم، به صورت هم‌زمان از روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی استفاده گردد (۱۴). از محدودیت‌های مطالعه عدم همکاری در بعضی از گاوداری‌ها بود که وارد مطالعه نشدند.

پیشنهاد می‌شود با توجه به نقش مهم *استافیلوکوکوس اورئوس* در التهاب پستان، در پژوهش‌های آینده ژن‌های مهم مقاومت آنتی‌بیوتیکی و همچنین تایپینگ ایزوله‌های این باکتری به منظور ردیابی منشاء عفونت در گاوداری‌ها بررسی شود.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دامداری‌های اطراف شهر یاسوج دارای شیوع بالایی از ژن‌های تشکیل دهنده بیوفیلیم و مستعد ایجاد بیوفیلیم می‌باشند. تشخیص سریع سویه‌های دارای تشکیل بیوفیلیم جهت اتخاذ تصمیمات درمانی و مدیریتی ضروری است. تشکیل بیوفیلیم با مقاومت آنتی‌بیوتیکی ارتباط تنگاتنگی دارد، لذا شیوع بالای تشکیل بیوفیلیم در سویه‌های جدا شده از گاوداری‌های مورد بررسی

REFERENCES

1. Seixas R, Varanda D, Bexiga R, Tavares L, Oliveira M. Biofilm-formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolates from subclinical mastitis in conditions mimicking the udder environment. *Pol J Vet Sci* 2015; 18(4): 787-92.
2. Bardiau M, Caplin J, Detilleux J, Graber H, Moroni P, Taminiau B, et al. Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. *Veterinary Microbiology* 2016; 185:1-6.
3. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa Í, Penadés JR. Bap a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology* 2001; 183(9): 2888-96.
4. Salimena AP, Lange CC, Camussone C, Signorini M, Calvino LF, Brito MA, et al. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms. *Veterinary Research Communications* 2016; 40(3-4): 97-106.
5. Ciftci A, Findik A, Onuk EE, Savasan S. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology* 2009; 40(2): 254-61.
6. Boles BR, Thoendel M, Roth AJ, Horswill AR. Identification of genes involved in polysaccharide-independent *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *PLoS One* 2010; 5(4): e10146.
7. Zeconi A, Scali F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunology Letters* 2013; 150(1): 12-22.
8. Pereyra EA, Picech F, Renna MS, Baravalle C, Andreotti CS, Russi R, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Microbiology* 2016; 183: 69-77.
9. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, et al. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(12): 5442-8.
10. Sahebkhitiari N, Nochi Z, Eslampour M, Dabiri H, Bolfion M, Taherikalani M, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk of bovine subclinical mastitis in Tehran and Mashhad. *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica* 2011; 58(2): 113-21.
11. Kaiser TDL, Pereira EM, dos Santos KRN, Maciel ELN, Schuenck RP, Nunes APF. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2013; 75(3): 235-9.
12. Chavhan SK, Kalorey DR, Nagdive AA, Purohit HJ, Barbudhe SB, Kurkure NV. Molecular characterization of intercellular adhesion gene in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk. *Tropical Animal Health and Production* 2012; 44(2): 247-52.
13. Piccinini R, Borromeo V, Zeconi A. Relationship between *S. aureus* gene pattern and dairy herd mastitis prevalence. *Veterinary Microbiology* 2010; 145(1): 100-5.
14. Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology* 2003; 92(1): 179-85.
15. Oliveira M, Bexiga R, Nunes S, Carneiro C, Cavaco L, Bernardo F, et al. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Veterinary Microbiology* 2006; 118(1): 133-40.
16. Iorio NLP, Lopes APdCN, Schuenck RP, Barcellos AG, Olendzki AN, Lopez GL, et al. A combination of methods to evaluate biofilm production may help to determine the clinical relevance of *Staphylococcus* in blood cultures. *Microbiology and Immunology* 2011; 55(1): 28-33.

17. Melo PdC, Ferreira LM, Nader Filho A, Zafalon LF, Vicente HIG, Souza Vd. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology* 2013; 44(1): 119-24.
18. Gad GFM, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H, El-Baky RMA. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *The Journal of Infection in Developing Countries* 2009; 3(05): 342-51.
19. Baselga R, Albizu I, De La Cruz M, Del Cacho E, Barberan M, Amorena B. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. *Infection and Immunity* 1993; 61(11): 4857-62.
20. Emaneini M, Khoramrooz SS, Shahsavani S, Dabiri H, Jabalameli F. Prevalence of panton-valentine leukocidin and phenotypic and genotypic characterization of biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from children with adenoid hypertrophy. *Microbial Pathogenesis* 2015; 89: 150-3.
21. Bekir K, Haddad O, Grissa M, Chaieb K, Bakhrouf A, Elgarssdi SI. Molecular detection of adhesin genes and biofilm formation in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research* 2012; 6(23): 4908-17.
22. Khoramian B, Emaneini M, Bolourchi M, Eslampour MA, Niasari-Naslaji A, Aligholi M, et al. Evaluation of the biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Iran. *Journal of Comparative Pathobiology* 2009; 6(4): 109-14.
23. Ando E, Monden K, Mitsuhashi R, Kariyama R, Kumon H. Biofilm formation among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with urinary tract infection. *Acta Medica Okayama* 2004; 58(4):207-14.
24. Darwish SF, Asfour HA. Investigation of biofilm forming ability in *Staphylococci* causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *The Scientific World Journal* 2013: 378492.
25. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(6): 2151-6.
26. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and Immunity* 1999; 67(10): 5427-33.
27. Vázquez-Sánchez D, Habimana O, Holck A. Impact of food-related environmental factors on the adherence and biofilm formation of natural *Staphylococcus aureus* isolates. *Current Microbiology* 2013; 66(2): 110-21.

High Frequency of Biofilm Related Genes (*IcaD*, *FnbA*, *IcaA* and *ClfA*) Among *Staphylococcus aureus* Isolated From Bovine with Subclinical Mastitis

Mansouri F¹, Khoramrooz SS^{2*}, Mahmoudi- Mourderaz M³, Marashifard M³, Malek Hosseini SAA³

¹Department of Basic Sciences, Islamic Azad University, Yasooj Branch, Yasooj, Iran, ²Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, ³ Student Research Committee, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 02 Mar 2019 Accepted: 09 June 2019

Abstract

Background & aim: Regarding to the importance of *S. aureus* colonization in bovine mastitis and the role of biofilm in its pathogenesis, the aim of this study was to determine the phenotypic production of biofilm and subsequently identify genes related to biofilm production in isolates of *S. aureus* from bovine with subclinical mastitis.

Methods: In the present cross-sectional study, a total of 502 milk samples were collected from bovine with subclinical mastitis in Boyerahmad and Dena townships. After isolation of bacteria was completed, the detection of *nucA* gene by PCR method was conducted for the final confirmation of *S. aureus*. Congo Red Agar plate was used for the assessment of biofilm production. The PCR method was used for the detection of *icaA*, *icaD*, *fnbA*, *clfA*, *cna* and *bap* genes. The collected data was analyzed by the SPSS software version 15 and chi-square test.

Results: A total of 80 (15.9%) isolates of *Staphylococcus aureus* were isolated, of which 55 (68.7%) isolates were able to form biofilms. The highest frequency of *icaD* gene was identified in 87.5% of isolates and *bap* gene with the lowest frequency (5%). Significant association were observed between biofilm production and presence of *icaD*($p=0.0001$), *icaA*($p=0.003$), *fnbA*($p=0.0001$) and *clfA*($p=0.0001$).

Conclusion: Considering the important role of biofilm in development of antibiotic resistance and high frequency of biofilm producer isolates, this finding should be considered as an alarm. Hence, the biofilm production helps the bacterial colonization and the pathogenesis could lead to economical and healthcare burden on the community.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Biofilm, Biofilm Related Genes, Mastitis

***Corresponding author:** Khoramrooz SS, Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Email: khoramrooz@gmail.com

Please cite this article as follows:

Mansouri F, Khoramrooz SS, Mahmoudi- Mourderaz M, Marashifard M, Malek Hosseini SAA. High Frequency of Biofilm Related Genes(*IcaD*, *FnbA*, *IcaA* and *ClfA*) Among *Staphylococcus aureus* Isolated From Bovine with Subclinical Mastitis. Armaghane-danesh 2020; 25(3): 384-397.