ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۵، شماره۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۹(شماره پی در پی ۱۴۰)

فراوانی بالای ژن‌های مرتبط با تولید بیوفیلم (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[۳]، سید علی‌اصغر ملک‌حسینی[۳]

[۱]گروه علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یاسوج، یاسوج، ایران، [۲]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران،[۳]کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۱۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به اهمیت کلونیزاسیون *استافیلوکوکوس ارئوس* در التهاب پستان گاو و نقش بیوفیلم در روند بیماری‌زایی، 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 از پستان از گاوهای مبتلا به التهاب پستان بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی ـ 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 بیوفیلم به روش کنگورد آگارپلیت صورت گرفت. جهت شناسایی و تکثیر ژن‌های مرتبط با بیوفیلم(icaA، icaD، fnbA، clfA، cna وbap) از روش مولکولی PCR استفاده شد. داده‌ها با استفاده از روش‌های اماری توصیفی و آزمون آماری مجذور کای تجزیه وتحلیل شدند.

یافته‌ها: در مجموع ۸۰(۱۵/۹ درصد) ایزوله *استافیلوکوکوس ارئوس* جداسازی شد، که از میان آنها ۵۵(۶۸/۷ درصد) ایزوله توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند. بالاترین فراوانی مربوط به ژنicaD در۸۷/۵ درصد ایزوله‌ها و ژن bap با کمترین فراوانی در٤ ایزوله(۵ درصد)شناسایی شد. تولید بیوفیلم به وسیله باکتری‌ها با حضور ژن‌های icaD(p=۰/۰۰۰۱)، icaA(p=۰/۰۰۳)، fnbA(p=۰/۰۰۰۱) و clfA(p=۰/۰۰۰۱) از نظر آماری ارتباط معنی‌دار داشت.

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

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

***نویسنده مسئول: سید سجاد خرم روز**، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی
Email: khoramrooz@gmail.com

مقدمه

التهاب پستان[1] گاو که به وسیله میکروارگانیسم‌های 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 بیوفیلم است که به عنوان یک فاکتور ویرولانس برای باکتری به شمار می‌رود. نقش بیوفیلم برای باکتری، اتصال باکتری به سطوح مختلف، کسب مواد غذایی و حفاظت از ارگانیسم در برابر استرس‌های محیطی و ترکیبات ضدمیکروبی است(۱). بیوفیلم ساختاری پلی‌مریک است که اجتماعی از سلول‌ها در اطراف خود ایجاد می‌کنند و از طریق آن به سطوح زنده و غیرزنده متصل می‌شوند. بیوفیلم 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 بیوفیلم 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[2] که حاوی چهار ژن icaA، icaB، icaC و icaD می‌باشد، کد می‌شود. ژن icaA کد کننده آنزیم N-استیل گلوکزآمینیل 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 بیوفیلم 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

1- Mastitis
2- Locus

عنوان فاکتور ویرولانس 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 پلی ساکاریدی 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[1] 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 نام‌هایFnBPA و FnBPB را نام برد که قادر هستند به فیبرونکتین و الاستین متصل گردند، در عین حال FnBPA قادر است به فیبرینوژن 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 ClfA و ClfB می‌باشند که با اتصال به فیبرینوژن 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 کریستنسن، 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)

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 اگار و بلاد اگار 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، کواگولاز 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(۱۰ و ۹).

بررسی فنوتیپی بیوفیلم بر روی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* به روش کنگورد آگارپلیت[1] صورت گرفت. برای تهیه محیط کنگورد آگار میزان ۰/۸ گرم رنگ کنگورد(سیگما- آلمان)، ۱۵ گرم کلریدسدیم و ۳۶گرم 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 ونکومایسین با غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به محیط اضافه گردید(۱۱). برای انجام بررسی فنوتیپی تولید بیوفیلم، از کشت شبانه استافیلوکوکوس اورئوس بر روی محیط نوترینت آگار[2]، سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند 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 بیوفیلم ثبت و بررسی شد. کلنی‌های قرمز نشان دهنده عدم تشکیل بیوفیلم و کلنی قهوه‌ای و سیاه نشان دهنده تشکیل بیوفیلم به وسیله ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* بود.

به منظور شناسایی ژن‌های تشکیل دهنده بیوفیلم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* ابتدا استخراج DNA به روش جوشاندن[3] 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 ۱۰دقیقه 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

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

دهنده بیوفیلم یعنی icaA، icaD، fnbA، clfA، 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 واکنشPCR در دستگاه ترموسایکلر Biorad T100 USA شامل دناتوراشیون اولیه در دمای۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون ثانویه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمر ٤۹ درجه سانتی‌گراد برای ژن‌های icaA و icaD ، ۵۲ برای ژن fnbA، ٥٤ درجه سانتی‌گراد برای cna و ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ژن‌های clfA وbap به مدت ٤۰ ثانیه و دمای امپلیفیکاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦۰ ثانیه و در نهایت پس از پایان سیکل‌ها، تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ 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 داکیومنت(میجرسینس تایوان) عکس‌برداری، مشاهده و بررسی باندها انجام گرفت.

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*(۳٤ 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 (۲٦/۹۲ 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 ٦۸/۷ 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 وD فاقد قدرت تولید

بیوفیلم بودند و صفر درصد گزارش گردید(جدول۳ و تصویر ۱).

وجود ژن‌های تشکیل دهنده بیوفیلم به تفکیک دامداری‌ها به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز(PCR) مورد بررسی قرار گرفتند که ژن‌هایicaD، fnbA، icaA، clfA، cna و bap به ترتیب دارای بیشترین فراوانی در همه دامداری‌ها بودند و در منطقه H همه ژن‌ها به صورت ۱۰۰ درصد وجود داشتند(جدول ٤). فراوانی این ژن‌ها در مجموع کل ۸۰ ایزوله *استافیلوکوکوس ارئوس* در جدول ٥ آمده است که ۷۰ ایزوله(۸۷/٥ درصد) دارای ژنicaD دارای بیشترین فراوانی و ٤ ایزوله(٥ درصد) دارای ژن bapدارای کمترین فراوانی بودند. تصویر ۲ الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن‌های مورد نظر را بر روی ژل آگارز نشان می‌دهد.

در این مطالعه تولید بیوفیلم به وسیله باکتری‌ها با حضور ژن‌های icaD(p=۰/۰۰۰۱)، icaA(p=۰/۰۰۳)، fnbA(p=۰/۰۰۰۱) وclfA(p=۰/۰۰۰۱) از نظر آماری ارتباط معنی‌دار داشت. در این مطالعه، ۹٦/٤٤ درصد باکتری‌هایی که تولید بیوفیلم داشتند ژن icaD، ٦۷/۳ درصد ژن icaA، ۸۹/۱ درصد ژنfnbA و ۹٦/۱ درصد ژنclfA را حمل می‌کردند(نمودار ۱).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های تشکیل دهنده بیوفیلم به همراه اندازه قطعات

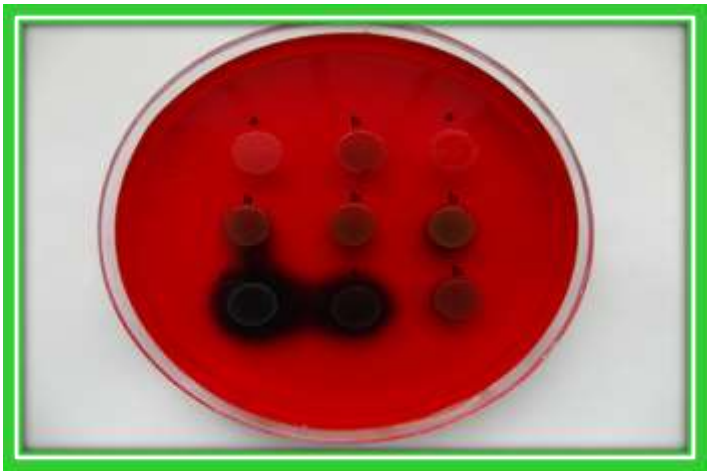
نام ژن	پرایمرها(□۳-□٥)	اندازه قطعه تکثیر شده(bp)	منبع
icaA	F-CCTAACTAACGAAAGGTAG R-AAGATATAGCGATAAGTGC	۱۳۱٥	(۲۹)
icaD	F-AAACGTAAGAGAGGTGG R-GGCAATATGATCAAGATAC	۳۸۱	(۲۹)
fnbA	F-GATACAAACCCAGGTGGTGG R-TGTGCTTGACCATGCTCTTC	۱۹۱	(۳۳)
clfA	F-CCGGATCCGTAGCTGCAGATGCACC R-GCTCTAGATCACTCATCAGGTTGTTCAGG	۱۰۰۰	(۳۳)
cna	F-AAAGCGTTGCCTAGTGGAGAC R-AGTGCCTTCCCAAACCTTTT	۱۹۲	(۳۳)
bap	F-CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTG R-GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	۹۷۱	(۲۹)

جدول ۲: فراوانی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* به تفکیک دامداری‌ها

منطقه	تعداد نمونه شیر	تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس	درصد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس(درصد آلودگی)
A	۲۰٥	۲٤	۱۱/۷۰
B	۱٤۸	۳٤	۲۲/۹۷
C	٤٤	۸	۱۸/۱۸
D	۳۰	۲	٦/٦٦
E	۲٦	۷	۲٦/۹۲
F	۲۰	۰	۰
G	۱٦	٤	۲٥
H	۱۳	۱	۷/٦۹
جمع کل	٥۰۲	۸۰	

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

منطقه	تعداد باکتری جداشده	تعداد باکتری مولد بیوفیلم	درصد تولید بیوفیلم
G	٤	٤	١٠٠
B	٣٤	٣١	٩١/١٧
C	٨	٧	٨٧/٥
E	٧	٦	٨٥/٧
A	٢٤	٧	٢٩/١٦
D	٢	٠	٠
H	١	٠	٠



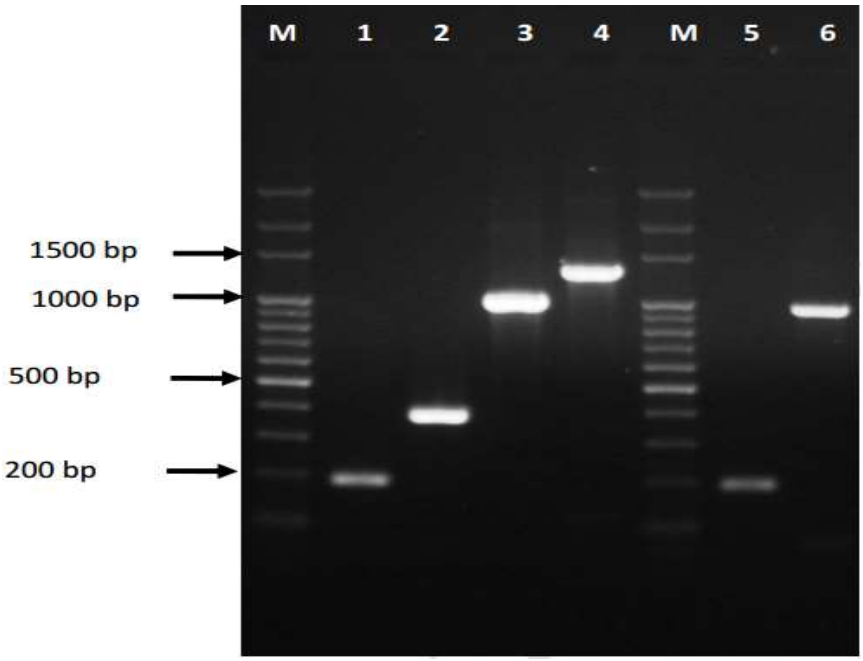
تصویر ۱ : بررسی فنوتیپی بیوفیلم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* :a کلنی‌های بی‌رنگ نشان دهنده عدم تشکیل بیوفیلم، b رنگ قهوه‌ای تولید بیوفیلم متوسط و c کلونی‌های سیاه نشان دهنده تشکیل بیوفیلم قوی

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

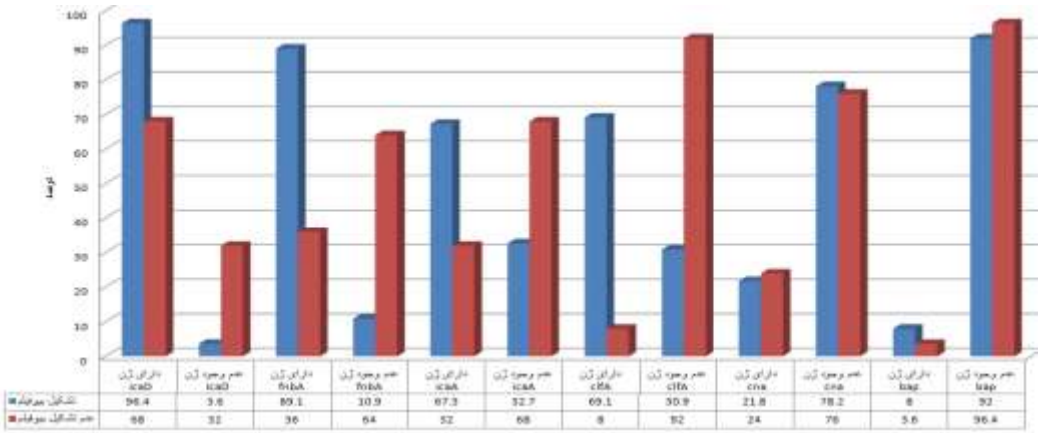
ژن / منطقه	icaD	fnbA	icaA	clfA	Cna	Bap
A	٧٩/١٦	٤٥/٨٣	٤١/٦٦	٢٥	١٦/٦٦	٨/٣٣
B	٩٤/١١	٨٢/٣٥	٦١/٧٦	٧٣/٥٢	٢٣/٥٢	٢/٩٤
C	٧٥	٧٥	٦٢/٥	٢٥	٢٥	٠
D	١٠٠	١٠٠	١٠٠	٠	٠	٠
E	٨٥/٧١	٨٥/٧١	٥٧/١٤	٥٧/١٤	٢٨/٥٧	٠
G	١٠٠	١٠٠	٥٠	٥٠	٢٥	٠
H	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠

جدول۵: 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	٤٥	٥٦/٢٥
٤	clfA	٤٠	٥٠
٥	cna	۱۸	۲۲/٥
٦	bap	٤	٥



تصویر ۲: محصولات واکنش PCR مربوط به ژن های 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 ۳۸۱ جفت‌باز، شماره ۳ ژن clfA با ۱۰۰۰ جفت‌باز، شماره ٤ ژن icaA با ۱۳۱٥ جفت‌باز، شماره ٥ ژن fnbA با ۱۹۱ جفت‌باز و شمار ٦ 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

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 و۱۲). بیماری‌زایی *استافیلوکوکوس ارئوس* با فاکتورهایی از قبیل؛ توکسین، ادهسین‌های 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).

در مطالعه حاضر ۸۰ نمونه به عنوان *استافلوکوکوس ارئوس* جداسازی شد و سپس با روش کنگوردآگارپلیت 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 وهمکاران 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 پولیانا وهمکاران(۸۵ درصد)(۱۷)، گاد وهمکاران(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 کنگوردآگار مؤثر باشند(۵).

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

هـایپرتروفی آدنوئیـد جهـت بررسـی تولیـد بیـوفیلم دریافتند که ۱۰۰ درصد نمونه‌ها تولید بیوفیلم داشـتند و میـزان تشـکیل بیـوفیلم بیشـتر از مطالعـه حاضـر بود(۲۰). هم‌چنـین کاریمـا و همکـاران بـه ایـن نتیجـه رسیدند که ۵۱/۲ درصد نمونه‌های جـدا شـده از بینـی کودکان تولید کننده بیوفیلم هستند(۲۱).

هم‌چنین نتایج حاصـل از روش مولکـولی PCR در پژوهش حاضر نشان داد که درصد ژن‌های تشکیل دهنـده بیـوفیلم icaD، fnbA، icaA، clfA، cna و bap بـه ترتیـب؛ ۸۷/۵، ۷۲/۵، ۵۶/۲۵، ۵۰، ۲۲/۵ و ۵ درصـد بوده است. خرمیان طوسی و همکاران در مطالعه خود بر روی *استافیلوکوکوس‌های* جدا شـده از شـیر گـاو، فراوانی ژن‌هـای icaA و icaD را ۷۸/۷ درصـد گـزارش کردنـد(۲۲). آنـدو و همکـاران بـا مطالعـه *استافیلوکوکوس‌های* مقاوم به متی سیلین جدا شده از عفونت‌های ادراری درصـد ژن‌هـای fnbA و bap را بـه ترتیـب ۷۲/۵ و ۵/۵ درصـد گـزارش کردنـد(۲۳). در مطالعـه سـیفت سـی و همکـاران بـر روی ۵۹ ایزولـه *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از گاوهای مبتلا بـه التهـاب پسـتان، ۲۷/۱ درصـد از ایزولـه‌هـا دارای ژن icaA، ۶۴/۴ درصد از ایزوله‌ها دارای ژن icaD و ۲۵/۴ درصد از مجمـوع ایزولـه‌هـا دارای هـر دو ژن icaA و icaD بودند(۵). سـماح وهمکـاران بـا *اسـتافیلوکوکوس ارئـوس*هـای جـدا شـده از گاوهـای مبـتلا بـه التهـاب پستان، فراوانـی ژن icaD را ۶۲/۵ درصـد، ژن icaA را ۱۵ درصد وژن bap را ۲۵ درصد گزارش کردنـد(۲۴). در مطالعه کاریما و همکاران فراوانـی ژن‌هـای icaA و icaD، ۵۶/۱۱ درصد، ژن cna، ۳۴/۱۱ درصـد، ژنfnbA، ۵۶/۱ درصـد گـزارش شـد و ژن clfA در هـیچ‌کـدام از ایزوله‌ها وجود نداشـت(۲۱) کـه نتـایج حاصـل از ایـن پژوهش‌ها از نظر فراوانی ژن‌های fnbA وbap با مطالعه آندو و از نظر فراوانی ژن icaA با مطالعه انجام گرفتـه به وسیله کاریما مطابقت داشت.

مطالعه آرشیولا و همکاران نشان داد که تغییر فنوتیپی ممکن است با عدم وجود ژن‌هـای icaA و icaD و یا حذف کامل لوکـوس ica در ارتبـاط باشـد(۲۵). از طرفـی کرامتـون و همکـاران طـی مطالعـه‌ای مشـاهده کردند که گونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از گاوهای مبتلا بـه التهـاب پسـتان علـی‌رغـم داشـتن جایگاه ica نتوانستند در شرایط آزمایشـگاهی بیـوفیلم تشـکیل دهنـد(۲۶). بررسـی و مقایسـه نتـایج تولیـد بیوفیلم و فراوانی ژن‌هـای تشـکیل دهنـده بیـوفیلم در مطالعه حاضر و سـایر پـژوهش‌هـا نتـایج متغیـری را نشان داد. علت این تفاوت را می‌توان به مواردی نظیـر منبع جداسازی باکتری، منطقه جغرافیـای متفـاوت، pH محیط، دما و دیگر فاکتورهای محیطی مؤثر بر تشکیل بیوفیلم نسبت داد(۲۷). برخی پژوهش‌های انجام شـده نشان داده‌اند که حتی در صورت وجود لکـوس ica در باکتری، به دلیل حساسـیت بسـیار بـالای بـاکتری بـه شرایط محیطی، تشکیل بیوفیلم بـه وسـیله بـاکتری بـا شکست مواجه شده است. در عـین حـال، شکسـت در تشـکیل بیـوفیلم بـه وسـیله *اسـتافیلوکوکوس ارئـوس* می‌تواند به دلایل خذف لکوس ica از باکتری و یا بروز جهش نقطه‌ای در این لکوس یا دیگـر فاکتورهـایی کـه

موجب تنظیم منفی تولید PIA و تأثیر بر تولید بیوفیلم می‌گردند، باشد. علاوه بر این بیان فنوتیپی تشکیل بیوفیلم 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 ارئوس* تشکیل دهنده بیوفیلم، 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 می شود با توجه به نقش مهم *استافیلوکوکوس ارئوس* 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 بیوفیلم و مستعد ایجاد بیوفیلم می‌باشند. تشخیص سریع سویه‌های دارای تشکیل بیوفیلم جهت اتخاذ تصمیمات درمانی ومدیریتی ضروری است. تشکیل بیوفیلم با مقاومت آنتی‌بیوتیکی ارتباط تنگاتنگی دارد، لذا شیوع بالای تشکیل بیوفیلم در سویه‌های جدا شده از گاوداری‌های مورد بررسی زنگ خطر محسوب می‌شود چرا که مصرف بالای محصولات لبنی به وسیله مردم و از طرف دیگر مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی ناشی از تولید بیوفیلم 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.

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, Calvinho 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 Researchcommunications 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.Zecconi 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 expressionduring 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.Sahebekhtiari 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. Modificationof 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, Barbuddhe 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, Zecconi A. Relationship between S. Aureus gene pattern and dairy herdmastitis 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. Veterinarymicrobiology 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, Shahsavan S, Dabiri H, Jabalameli F. Prevalence of panton-valentine ieucocidin 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 adhesins genes and biofilm formation in methicillin resistant Staphylococcus aureus. African Journal of Microbiology Research 2012; 6(23): 4908-17.

22.Khoramian B, E Emanein 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 Pathobiollogy 2009; 6(4): 109-14.

23.Ando E, Monden K, Mitsuhata 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 icaDGenesand 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.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

High Frequency of Biofilm Related Genes (*Ica*D, *Fnb*A, *IcaA* and *Clf*A) Among *Staphylococcus aureus* Isolated From Bovine with Subclinical Mastitis

Mansouri F[1], Khoramrooz SS[2]*, Mahmoudi- Mourderaz M[3], Marashifard M[3], Malek Hosseini SAA[3]

[1]Department of Basic Sciences, Islamic Azad University, Yasooj Branch, Yasooj, Iran, [2]Cellular 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 *nuc*A 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 *ica*A, *ica*D, *fnb*A, *clf*A, *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), *ica*A(p=0.003), *fnbA*(p=0.0001) and *clf*A(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(*Ica*D, *Fnb*A, *IcaA* and *Clf*A) Among *Staphylococcus aureus* Isolated From Bovine with Subclinical Mastitis. Armaghane-danesh 2020; 25(3): 384-397.