*Research on Medicine* *Original Article*

*The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences* Vol.42; No.1; 2018

# Phenotypic and genotypic study of Staphylococcus aureus biofilm genes isolated from clinical and food cases using microtitrplate and Multiplex PCR

**Sareh Beigom Madani, Kumarss Amini***

*Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran*

(Received: 2017/08/26 Accept: 2017/12/13)

## Abstract

***Background:*** *The most important factor in the formation of Staphylococcus aureus is the ability to form biofilms. This bacterium has the ability to bind and penetrate into tissue cells. Biofilmic infections are usually chronic and reversible and respond to difficult treatments. The purpose of the present study was to identify biofilm genes in Staphylococcus aureus isolated from clinical and food samples using multiple PCR methods.*

***Materials and Methods:*** *A total of 60 isolates of Staphylococcus aureus, cultured from human and food after extraction of genome, were used to study the presence of adherent genes using multiple PCR techniques. The phenotypic study of biofilm formation was performed using Microtiter plates assay microplate technique.*

***Results:*** *In total, 60 human and food samples were studied that included 6 samples of foodstuff, 20% of samples and of 2 samples clinical 6.67% isolated from biofilms. In 30 isolates isolated from food, the frequencies of fnbB, clfB, and clfA genes were identified as 20%, 76.66%, 80%, respectively. However, among the 30 clinical samples, the frequencies of fnbB, clfB, and clfA genes were 6.66%, 70%, and 93.33%, respectively. The fnbA gene was not detected in any of the samples.*

***Conclusion:*** *The results of the study showed that the high prevalence of biofilm-inducing genes and also a relatively high phenotypic expression among the samples showed that it could be related to the resistance of the isolates of Staphylococcus aureus.*

***Keywords:*** *Staphylococcus Aureus; Biofilm Genes; Multiplex PCR*

* *Corresponding Author: Kumarss Amini*
*Email: dr_kumarss_amini@yahoo.com*

[ Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17 ]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دوره ۴۲، شماره ۱، ۱۳۹۷، صفحات ۵۲ تا ۵۸

# بررسی فنوتیپی وژنوتیپی ژن‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد بالینی و غذایی با روش میکروتیترپلیت و Multiplex PCR

**ساره بیگم مدنی، کیومرث امینی***

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۶/۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۹/۲۲

## چکیده:

**سابقه وهدف:** مهم‌ترین فاکتور حدت استافیلوکوکوس اورئوس توانایی تشکیل بیوفیلم است. این باکتري توانایی اتصال و نفوذ به داخل سلول‌های بافت را دارد. عفونت‌های بیوفیلمی به طور معمول مزمن و برگشت‌پذیر بوده و به درمان دشوار پاسخ می‌دهند. هدف از تحقیق حاضر، شناسایی ژن‌های بیوفیلم در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی و مواد غذایی با استفاده از روش *PCR* چندگانه است.

**روش بررسی:** در این مطالعه با استفاده از تکنیک *PCR* چندگانه، ۶۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس کشت شده از انسان و مواد غذایی پس از استخراج ژنوم، برای بررسی حضور ژن‌های ادهزین بررسی شد. بررسي فنوتیپی تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش میکرو پلیت تیتراسیون *Microtiter plates assay* انجام شد.

**یافته‌ها:** در مجموع تعداد ۶۰ نمونه مواد غذایی و انسانی مورد مطالعه تعداد ۶ نمونه ماده غذایی ۲۰درصد و از بین نمونه‌های انسانی ۲ ایزوله ۶/۶۷درصد توان تشکیل بیوفیلم را به طور متوسط داشته‌اند. همچنین در ۳۰ ایزوله جداسازی شده از مواد غذایی، فراوانی ژن‌های *fnbB, clfB, clfA* به ترتیب ۸۰درصد، ۷۶/۶۶درصد، ۲۰درصد شناسایی شد. در حالی که در بین ۳۰ نمونه بالینی فراوانی ژن‌های *fnbB, clfB, clfA* به ترتیب ۹۳/۳۳درصد، ۷۰درصد و ۶/۶۶درصد گزارش شد. ژن *fnbA* در هیچ‌یک از نمونه‌ها شناسایی نشد.

**نتیجه‌گیری:** فراوانی شیوع ژن‌هاي ایجادکننده بیوفیلم وهمچنین بیان فنوتیپی به نسبت بالایی را در بین نمونه‌های بررسی شده نشان داد که به احتمال می‌تواند با بروز مقاومت در بین ایزوله‌های استاف اورئوس مرتبط باشد.

**واژگان کلیدی:** استافیلوکوکوس اورئوس، ژن بیوفیلم، *PCR* چندگانه‌ای

## مقدمه:

عوامل بیماری‌زای غذایی، تهدیدکننده جدی برای بهداشت عمومی کشورها به شمار می‌آید که‌می‌تواند توسط رعایت اصول بهداشتی در پروسه‌های تهیه مواد غذایی از وقوع آن‌ها جلوگیری کرد. عفونت‌ها و مسمومیت–های ناشی از موادغذایی اثر مهمی بر سلامت عمومی دارد(۱). موادغذایی که به مسمومیت استافیلوکوکی دچار می‌شود، انواع موادی که حاوی کرم یا خامه است، گوشت‌هایی که بعد از پختن در دمای معمولی اتاق نگهداری شوند، همچنین سالادها، پنیر و بستنی را نام برد(۲).

انتروتوکسین‌ها تنها توسط برخی از گونه‌ها و سویه‌های استافیلوکوکوس تولید می‌شوند. توکسین ها عوامل مهمی در ایجاد مسمومیت ناشی از مواد غذایی هستند. از طرفی، این توکسین‌ها می‌توانند در شیر ترشح شوند و در نتیجه شیر و فرآورده‌های شیری گاو مبتلا به تورم پستان ناشی از استافیلوکوکسی‌ها باعث بروز مسمومیت غذایی در انسان می‌شود(۴،۳). یکی از عوامل مهم در افزایش قدرت بیماری‌زایی و مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی، توانایی تشکیل بیوفیلم است. بیش از ۸۰ درصد عفونت‌های مزمن باکتریایی ناشی از تشکیل بیوفیلم است. بیوفیلم جمعیت میکروبی پیچیده و به هم چسبیده‌ای است که توسط یک ماده زمینه‌ای پلیمری خارج سلولی که توسط خود میکروب تولید می‌شود، احاطه شده است. بیوفیلم دارای ویژگی–های کلینیکی است و باکتری‌های موجود در آن دارای مقاومت ذاتی به آنتی بیوتیک‌ها، ضدعفونی‌کننده‌ها و سیستم ایمنی میزبان هستند که این موضوع زمینه‌ساز مقاومت به درمان است(۵).

**نویسنده مسئول:** کیومرث امینی

**پست الکترونیک:** *dr_kumarss_amini@yahoo.com*



[ Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17 ]

به اجتماعی از میکروارگانیسم‌ها و تولیدات میکروبی که به سطحی از سلول متصل شده باشند بیوفیلم گویند. به طورعموم بیوفیلم از سلول‌های میکروارگانیسم‌ها که روی یک سطح تثبیت شده‌اند و در یک پلیمر خارج سلولی با منشا میکروبی فرو رفته‌اند، تشکیل شده است. سلول‌های باکتریایی به طور تقریبی به اکثر سطوحی که در محیطی مایع قرار دارند، مستحکم متصل می‌شوند. باکتری‌ها با تشکیل بیوفیلم، سبب مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی، مقاومت در برابر سیستم ایمنی میزبان و حفظ شرایط فیزیکی و شیمیایی مناسب برای رشد می‌شوند و این امر سبب مقاومت بیوفیلم‌ها در شرایط نامساعد می‌شود. بیوفیلم‌ها به مزمن شدن بیماری–ها و فساد مواد غذایی منجر می‌شوند(۴). در صنایع غذایی اتصال باکتری‌های پاتوژن و فاسدکننده مواد غذایی با سطوح در تماس با مواد غذایی در فرآیندهای تولید و بسته‌بندی و در نهایت تشکیل بیوفیلم‌های میکروبی می‌تواند عامل اصل فساد مواد غذایی و انتقال بیماری‌های ناشی از مواد غذایی باشد. توانایی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس برای اتصال به سطح و تشکیل بیوفیلم مرحله‌ای تعیین‌کننده از مزمن شدن بیماری است و در مواردی که باکتری قادر به تشکیل بیوفیلم باشد، میزان بروز عفونت بیمارستانی پیچیده افزایش می‌یابد. گسترش شیوع تشکیل بیوفیلم روی وسایل و تجهیزات، راهکارهای حذف آن از آلودگی‌ها را ضروری ساخته است. تشکیل بیوفیلم می‌تواند تحت تاثیر عوامل مختلف میزبان و میکروب باشد(۵، ۶).

باکتری استافیلوکوک اورئوس در پوست، غدد پوستی و غشاهای مخاطی جانوران وجود دارد(۷). امروزه از واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز به عنوان روشی حساس و دقیق در تشخیص به موقع عفونت‌های‌میکروبی استفاده می‌شود(۸). پایش و مراقبت بیماری‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس و تعیین منبع و منشا آلودگی در موارد وقوع بیماری و شناسایی ژن‌های دخیل در اتصال استافیلوکوکوس اورئوس با روشی سریع، حساس، با قابلیت تکرارپذیری و حساسیت بالا پس از جداسازی نمونه‌های استافیلوکوک مثبت از نمونه‌های بالینی در بیمارستان‌های شهر تهران بوده است(۹،۱۰). بررسی قدرت تولید ژن‌های موررد مطالعه سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از منابع دامی (شیر خام آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس) و نمونه‌های انسانی (از نمونه‌های زخم، بینی) و تعیین فراوانی ژن‌های *fnbA,fnbB,fib,clA,clB* استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های جداشده از انسان و موادغذایی دارای اهمیت ویژه است(۱۱). هدف و ضرورت از انجام این تحقیق در راستای شناسایی مولکولی ژن‌های *fnbA,fnbB,fib,clA,clB* در نمونه‌های استافیلوکوک اورئوس جدا شده از موارد بالینی توسط روش Multiplex PCR است.

## روش بررسی:

تحقیق حاضر به صورت توصیفی– مقطعی در سال۹۶ انجام شد. طی جمع‌آوری نمونه‌ها، تعداد ۲۰۵ نمونه شیر خام از دام‌هایی که دارای علایم ورم پستان بودند، جمع‌آوری شد. تعداد ۱۵۰ نمونه بالینی انسانی از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و برخی از مراکز درمانی بدون ارتباط با بیماران مراجعه‌کننده از بینی و زخم‌های بیماران اخذ شد. نمونه‌های انتقال داده شده به آزمایشگاه در محیط آگار خون‌دار (مرک، آلمان) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند. برای تعیین هویت باکتری–های رشد کرده، پس از انتقال آن‌ها به محیط کشت نوترینت آگار (هایمدیا، هند) از روش‌های استاندارد میکروب‌شناسی شامل رنگ‌آمیزی گرم، بررسی تولید کاتالاز و کوآگولاز، رشد در محیط DNase (مرک، آلمان) و مانیتول سالت آگار (مرک، آلمان) استفاده شد(۷).

روش میکروتیترپلیت Microtiter Plates Assay مانند تکنیک الایزا و کروموژن مولد رنگ در این تکنیک کریستال ویوله است که شدت رنگ حاصله با غلظت بیوفیلم رابطه مستقیم دارد(۱۲). روند تکرار آزمایش‌ها سه مرتبه متوالی بوده است.

ارزیابی فنوتیپی تولید بیوفیلم ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس: برای ارزیابی تولید بیوفیلم، کلنی‌های استافیلوکوکوس اورئوس غنی‌سازی شده روی محیط TSB(تریپتیکاز سوی براث) حاوی یک–درصد گلوکز کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از ۲۴ ساعت میکروپلیت‌ها به آرامی سه بار با محلول استریل PBS شست‌وشو داده شد و پلیت به صورت وارونه روی کاغذ صافی قرار گرفته تا خشک شود. سپس برای تثبیت از متانول استفاده و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به همه گودهها متانول اضافه و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. بعد از گذشت این زمان و خارج کردن الکل و خشک کردن پلیت در شرایط اتاق، به همه خانه‌های پلیت ۱۰۰ میکرولیتر از رنگ کریستال ویوله یک–درصد اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط اتاق قرار داده شد. سپس پلیت‌ها را به آرامی با آب شهری شست‌وشو داده تا رنگ اضافی خارج شود. سپس رنگ باند شده با ۱۵۰ میکرولیتر از اسید استیک ۳۳درصد آزاد شده و آماده قرائت با طول موج ۴۹۲ نانومتر الایزا ریدر شد. تمامی اندازه‌گیری‌ها با سه مرتبه تکرار انجام شد و از محیط کشت به تنهایی به عنوان کنترل منفی استفاده شد. انحراف معیار بالاتر از OD جذب نوری کنترل منفی به عنوان Cut-off استفاده شد. توانایی تشکیل بیوفیلم از فرمول‌های زیر محاسبه (۱۳) و به شرح جدول زیر بود.

### ارزیابی میزان تشکیل بیوفیلم

| ردیف | نحوه ارزیابی | میزان شدت رنگ‌سنجی (کالری متری) |
|---|---|---|
| ۱ | عدم تشکیل بیوفیلم | OD<ODC |
| ۲ | ضعیف | ODC<OD<2×ODC |
| ۳ | متوسط | 2×ODC < OD<4×ODC |
| ۴ | قوی | 4×ODC |

استخراج DNA : برای استخراج، از کیت تجاری مرکز ذخایر ژنتیکی ایران استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده در این تست مطابق جدول از شرکت تکاپو زیست (تهران، ایران) تهیه شد. آزمون PCR چندگانه‌ای برای شناسایی پنج ژن با استفاده از پنج زوج پرایمر در یک دستگاه ترمال سایکلرمدل (Eppendorf) انجام شد(۱۴). از سوش‌های رفرانس استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۵۹۲۳، ATCC ۲۹۲۱۳، ATCC ۳۳۵۹۱ به عنوان نمونه کنترل مثبت و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به عنوان کنترل منفی در این مطالعه استفاده شد.

برنامه زمانی: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۰ دقیقه، ۳۵ چرخه دمایی که شامل دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و مرحله اتصال در ۵۵ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه و امتداد در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در این مرحله برای جست‌وجوی ژن های مورد مطالعه واکنش PCR چندگانه‌ای، وجود قطعه‌های ۲۰۵ جفت بازی نشان‌دهنده وجود ژن *clfB*، ۲۹۲ جفت بازی نشان‌دهنده ژن *clfA*، ۴۰۴ جفت بازی نشان‌دهنده ژن *fib*، ۵۲۴ جفت بازی نشان‌دهنده ژن *fnbB*، ۶۴۳ جفت بازی نشان‌دهنده ژن *fnbA* بود. داده‌های آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ و با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی تجزیه و تحلیل شد.

## یافته‌ها:

**آزمایش‌های بیوشیمیایی و کشت باکتریولوژی:** نتایج بیوشیمیایی تست‌های بررسی شده در این تحقیق در نهایت به جداسازی ۶۰ جدایه از باکتری استافیلوکوک اورئوس منجرشد.

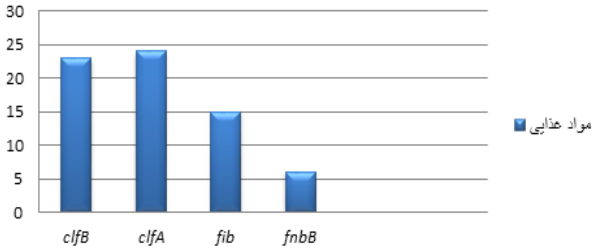
نتایج آزمون M-PCR سویه‌های استافیلوکوک اورئوس جدا شده از نمونه‌های غذایی: در این پژوهش از ۶۰ نمونه استافیلوکوک اورئوس جدا شده ۳۰ نمونه (۵۰درصد) از مواد غذایی حاوی یک یا چند ژن بودند. در میان ۳۰ نمونه، تعداد ۲۳ سویه (۷۶/۶۶درصد) دارای ژن *clfB*، ۲۴ سویه (۸۰درصد) حاوی ژن *clfA*، ۱۵ سویه (۵۰درصد) دارای ژن *fib*، ۶ سویه (۲۰درصد%) واجد ژن *fnbB* بوده‌اند (نمودار۱). ژن *fnbA* در هیچ‌یک از نمونه‌ها شناسایی نشد. در این

[ Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17 ]

توالی پرایمرهای اختصاصی مربوط به هر ژن و اندازه محصول PCR چندگانه‌ای از تکثیر آن‌ها(۱۵)

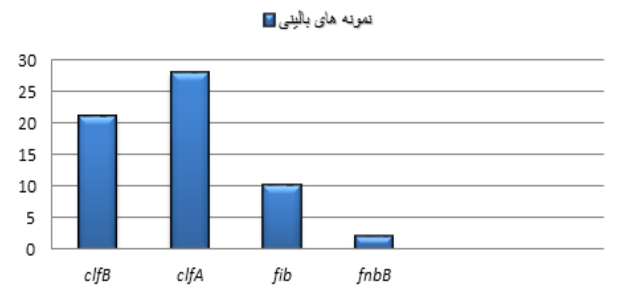
| ردیف | ژن | پرایمر | توالی نوکلئوتیدی پرایمر Nucleotide sequence 5′ ⟶ 3′ | اندازه محصول ( جفت باز) |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | fnbA | FNBA-1<br>FNBA-2 | GTGAAGTTTTAGAAGGTGGAAAGATTAG<br>GCTCTTGTAAGACCATTTTTCTTCAC | ۶۴۳ |
| ۲ | fnbB | FNBB-1<br>FNBB-2 | GTAACAGCTAATGGTCGAATTGATACT<br>CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC | ۵۲۴ |
| ۳ | fib | FIB-1<br>FIB-2 | CTACAACTACAATTGCCGTCAACAG<br>GCTCTTGTAAGACCATTTTCTTCAC | ۴۰۴ |
| ۴ | clfA | CLFA-1<br>CLFA-2 | ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT<br>CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG | ۲۹۲ |
| ۵ | clfB | CLFB-1<br>CLFB-2 | ACATCAGTAATAGTAGGGGGCAAC<br>TTCGCACTGTTTGTGTTTGCAC | ۲۰۵ |

تحقیق از نرم‌افزار spss ورژن ۱۹ استفاده شده است. (تصویر ۱و نمودار ۱).

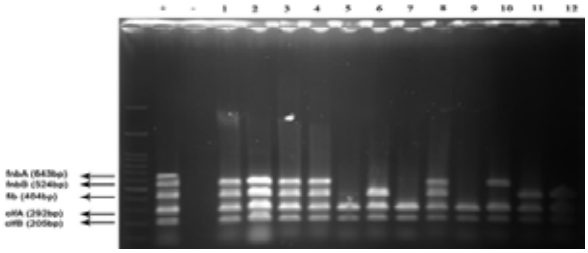



نمودار ۱: فراوانی ژن‌های مطالعه شده در نمونه‌های استافیلوکوک اورئوس جدا شده از مواد غذایی با روش M-PCR

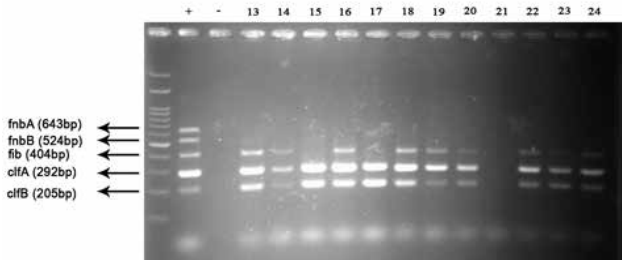
نتایج آزمون M-PCR سویه‌های استافیلوکوک اورئوس جدا شده از نمونه‌های بالینی: در این پژوهش از ۶۰ نمونه استافیلوکوک اورئوس جدا شده ۳۰ نمونه (۵۰درصد) از ایزوله‌های بالینی حاوی یک یا چند ژن بودند. در میان ۳۰ نمونه، تعداد ۲۱ سویه (۷۰درصد) دارای ژن *clfB*، ۲۸ سویه (۹۳/۳۳درصد) حاوی ژن *clfA*، ۱۰ سویه (۳۳/۳۳درصد) دارای ژن *fib*، ۲ سویه (۶/۶۶درصد) واجد ژن *fnbB* بوده‌اند (نمودار۲). ژن *fnbA* در هیچ یک از نمونه‌ها شناسایی نشد (تصویر ۲و نمودار ۲).




نمودار ۲ : فراوانی ژن‌های مورد مطالعه در نمونه‌های استافیلوکوک اورئوس جدا شده از نمونه‌های بالینی با روش M-PCR



تصویر۱: واکنش M-PCR برای شناسایی ژن‌های مورد مطالعه استافیلوکوک اورئوس در نمونه‌های مواد غذایی. ستون M: سایز مارکر bp ۱۰۰، کنترل مثبت واجد ژن *clfB* (۲۰۵ bp)، ژن *clfA* (۲۹۲bp)، ژن *fib* (۴۰۴bp)، ژن *fnbB* (۵۲۴bp)، ژن *fnbA* (۶۴۳bp)، کنترل منفی (استافیلوکوک اپیدرمیدیس).




تصویر ۲: واکنش M-PCR برای شناسایی ژن‌های مورد مطالعه استافیلوکوک اورئوس در نمونه‌های بالینی. ستون M: سایز مارکر ۱۰۰bp، کنترل مثبت واجد ژن *clfB* (۲۰۵ bp)، ژن *clfA* (۲۹۲bp)، ژن *fib* (۴۰۴bp)، ژن *fnbB* (۵۲۴bp)، ژن *fnbA* (۶۴۳bp)، کنترل منفی (استافیلوکوک اپیدرمیدیس).

نتایج بررسی تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت: از میان ۶۰ نمونه مواد غذایی و انسانی مطالعه‌شده ۶ نمونه ماده غذایی (۲۰درصد) و در نمونه‌های انسانی ۲ ایزوله ( ۶/۶۷ درصد) توان تشکیل بیوفیلم را به طور متوسط داشته‌اند و هیچ یک از ایزوله‌های غذایی و انسانی توانایی تشکیل بیوفیلم را به صورت قوی نداشته‌اند(جدول ۱). در بین نمونه‌های غذایی در مقایسه با نمونه‌های بالینی، میزان عدم تشکیل بیوفیلم کمتر بوده در حالی که میزان تشکیل ضعیف بیوفیلم

[ Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17 ]

جدول ۱ : توزیع ایزوله‌های انسانی و غذایی استاف اورئوس بر حسب تشکیل بیوفیلم

| ردیف | منبع نمونه | تعداد | میزان تشکیل بیوفیلم برحسب تعداد و درصد | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | عدم تشکیل بیوفیلم | تشکیل بیوفیلم ضعیف | تشکیل بیوفیلم متوسط | تشکیل بیوفیلم قوی |
| ۱ | بالینی | ۳۰ | ۶ (۲۰درصد) | ۲۲ (۷۳/۳۳درصد) | ۲ (۶/۶۷درصد) | – |
| ۲ | غذایی | ۳۰ | ۴ (۱۳/۳۴درصد) | ۲۰ (۶۶/۶۶درصد) | ۶ (۲۰درصد) | – |

در نمونه‌های بالینی بیشتر از مواد غذایی بوده است (جدول ۱و۲).

جدول ۲ : توزیع فراوانی بیوفیلم تشکیل شده و ژن‌های مطالعه شده در ایزوله‌های غذایی استاف اورئوس بر حسب تعداد و درصد

| بیوفیلم نمونه‌های مواد غذایی | *clfB* | *clfA* | *fib* | *fnbB* | *fnbA* |
|---|---|---|---|---|---|
| عدم تشکیل | – | ۱ (۵۰درصد) | – | ۱ (۵۰درصد) | – |
| بیوفیلم ضعیف | ۳ (۲۰درصد) | ۶ (۴۰درصد) | ۴ (۲۶/۶۶درصد) | ۲ (۱۳/۳۴درصد) | – |
| بیوفیلم متوسط | ۲۰ (۳۹/۲۱درصد) | ۱۷ (۳۳/۳۳درصد) | ۱۱ (۲۱/۵۶درصد) | ۳ (۵/۹درصد) | – |

جدول ۳ : توزیع فراوانی بیوفیلم تشکیل شده و ژن‌های مطالعه شده در ایزوله‌های انسانی استاف اورئوس بر حسب تعداد و درصد

| بیوفیلم نمونه‌های بالینی | *clfB* | *clfA* | *fib* | *fnbB* | *fnbA* |
|---|---|---|---|---|---|
| عدم تشکیل | – | ۱ (۵۰درصد) | ۱ (۵۰درصد) | – | – |
| بیوفیلم ضعیف | ۳ (۲۵درصد) | ۶ (۵۰درصد) | ۳ (۲۵درصد) | – | – |
| بیوفیلم متوسط | ۱۸ (۳۸/۲۹درصد) | ۲۱ (۴۴/۶۸درصد) | ۶ (۱۲/۷۷درصد) | ۲ (۴/۲۶درصد) | – |



تصویر۴ : میکروپلیت بعد از اضافه کردن اسید استیک آماده قرائت با دستگاه الایزا ریدر

## بحث:

در این مطالعه مشخص شد که از ۶۰ نمونه مواد غذایی و انسانی مطالعه شده، تعداد ۶نمونه ماده غذایی ۲۰درصد و از بین نمونه‌های انسانی ۲ ایزوله ۶/۶۷درصد توان تشکیل بیوفیلم را به طور متوسط داشته‌اند. همچنین فراوانی ژن‌های *fnbB, clfB, clfA* در نمونه‌های مواد غذایی به ترتیب ۵۰درصد، ۷۶/۶۶درصد و ۲۰درصد شناسایی شد. در حالی‌که در بین ۳۰ نمونه بالینی فراوانی ژن‌های *fnbB, clfB, clfA* به ترتیب۹۳/۳۳درصد، ۷۰درصد و ۶/۶۶درصد گزارش شد. باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از باکتری‌های مهم ایجادکننده عفونت در انسان و دام است که از راه مواد غذایی نیز منتقل می‌شود. این باکتری شیوع به نسبت بالایی دارد و میزان بروز مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی نیز در این باکتری روبه افزایش است. رشیدی‌نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۷ با مطالعه روی ۲۹۹ نمونه بالینی جداشده از بخش‌های مراقبت ویژه بیمارستانی، در مجموع ۱۰۵ سویه استاف اورئوس شناسایی کردندکه ۹۰/۵درصد از نمونه‌ها مقاوم به متی‌سیلین بود. همچنین ۹۱/۵درصد از نمونه‌ها دارای مقاومت چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی از خود بروز داده‌اند(۱۶). ایجاد بیوفیلم از عوامل بیماری‌زایی در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس است که آن را در برابر شرایط محیطی نامساعد و سیستم ایمنی میزبان محافظت می‌کند.

نوربخش و همکاران در سال ۱۳۹۴ گزارش کردند که تشکیل بیوفیلم یکی از عوامل بیماری‌زایی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس محسوب می‌شود که به باکتری امکان اتصال به سطوح مختلف و همچنین افزایش الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی را می‌دهد. مطالعه آن‌ها با هدف بررسی توان تشکیل بیوفیلم به روش مولکولی و فنوتیپی در نمونه‌های عفونی در شهرکرد انجام شد. نتایج نشان داد که ۷۳/۵ درصد از ایزوله‌ها توانایی اتصال قوی، ۵/۳۳ درصد توان اتصال متوسط و ۱۵/۴ درصد توانایی اتصال ضعیف را در تولید بیوفیلم نشان دادند. فراوانی حضور ژن icaC ۳/۶۷ درصد و ژن icaB ۲/۶۳ درصد برآورد شد. ۹۲/۲ درصد از ایزوله‌های مولد بیوفیلم واجد ژن *mecA* بودند. نتیجه آن که گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ویژه در ایزوله‌های مولد بیوفیلم مشکلات جدی در بخش‌های درمانی بیمارستان ایجاد خواهد کرد(۱۵).

استافیلوکوکوس اورئوس می‌تواند با تولید بیوفیلم، منبع مهمی برای گسترش عوامل عفونت‌زا روی سطوح مورد تماس با بیماران باشد. در این میان استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری–زا می‌تواند به بیماری‌زایی در انسان منجر شود. باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در میان باکتری‌های دیگر ربه خاطر تولید لایه لعابی شناخته شده است. باکتری‌هایی که قادر به تولید لایه لعابی نیستند بیوفیلم ضعیف–تری تشکیل می‌دهند. بیوفیلم با ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی نقش مهمی در بروز پدیده مقاومت حتی چنگانه در بین بیماران مبتلا دارد و روند درمانی را با اختلال همراه می کند(۱۴). Tristan و همکاران در سال ۲۰۰۳ با بررسی روی ژن‌های تولیدکننده بیوفیلم در ایزوله‌های استاف اورئوس به این نتیجه رسیدند که ۹۹درصد نمونه‌ها واجد



[ Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17 ]

ژن *clfA*، ۸۰درصد حاوی ژن *fib*، ۴۳درصد دارای ژن *fnbB*، ۲۸درصد واجد ژن *fnbA* بودند که به بروز بیماری‌های استئومیلیت، آرتریت اندوکاردیت جداسازی منجر شده‌اند(۱۴, ۱۷). Que و همکاران در سال ۲۰۰۱ در تحقیقی با موضوع نقش فاکتورهای جمع–کننده و پروتئین‌های فیبرونکتین استاف اورئوس و بیان آن‌ها در لاکتوباسیلوس لاکتیس اظهار کرده‌اند که رسپتورهای لازم فیبرونکتین شناسایی شده با عفونت‌های اندوکاردیت به طورکامل در ارتباط هستند(۱۸). دستمالچی در سال ۱۳۹۲ در تحقیق خود با موضوع بررسی فراوانی ژن‌های چسبندگی *fnbB* و cna، *fnbA* در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از موارد ورم پستان گزارش کردند که از بین ۴۵ نمونه به ترتیب ۳۹ و ۳۵ جدایه واجد ژن‌های *fnbB* و *fnbA* بوده‌اند(۱۹).

اولین بار کریستنسن Christensen و همکاران در سال ۱۹۹۵ در آمریکا از روش رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله برای بررسی میزان چسبندگی و تولید بیوفیلم در باکتری‌های استافیلوکوک کوآگولاز منفی استفاده کردند(۲۰). خرمیان طوسی و همکاران در سال ۱۳۸۸ طی پژوهشی که انجام دادند گزارش کردند که بررسی فنوتیپی تشکیل بیوفیلم با استفاده از میکروپلیت‌های تیتراسیون نشان داد که به ترتیب ۴/۴، ۴۰ و ۴۳/۳ درصد از ایزوله‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم به صورت قویف متوسط و ضعیف بوده و تنها ۱۲/۲ درصد از ایزوله‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم نبوده‌اند(۲۱).

شجاعی در تابستان ۱۳۹۳ در پژوهشی با عنوان بررسی توزیع ژن‌های مولد بیوفیلم در سویه‌های استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده از شیرهای خام عرضه شده در شهرستان سنندج گزارش کرد که بر اساس نتایج حاصل از Multiplex PCR ژن‌های مولد بیوفیلم *fnbA*، *clfaB* به ترتیب ۶۹/۳۸ درصد و ۳۲/۶ درصد بوده است. نتایج حاکی از آلودگی بالای شیر خام عرضه شده در سطح شهرستان سنندج به استافیلوکوکوس ارئوس و نیز قابلیت ایزوله‌هادر تشکیل بیوفیلم است (۲۲).

در مطالعه سال ۲۰۰۰ که از سوی ووانگ Wang و همکاران در آلمان انجام شد، ۷۸ درصد از ایزوله‌های عفونی استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه شده به عنوان نمونه‌های مولد بیوفیلم گزارش کردند که این آمار مشابه نتایج حاصل از تحقیق حاضر، نشان‌دهنده میزان بالای نمونه‌های مولد بیوفیلم در جدایه–های استافیلوکوکوس اورئوس است. در مطالعه حاضر تمام ایزوله‌های بررسی شده توان تولید بیوفیلم را در مقادیر ۷۳ درصد از ایزوله‌های مختلف دارا بودند که در این میان ۶/۶۷ درصد توان اتصال متوسط و ۷۳/۳۳ درصد توانایی اتصال ضعیف را در نمونه‌های مواد غذایی، ۶۶/۶۶ درصد از ایزوله‌ها توانایی اتصال ضعیف را در تولید بیوفیلم در بین نمونه‌های بالینی نشان دادند(۲۳, ۲۴).

افتخار و همکاران در تحقیقی که سال ۲۰۱۷ روی ۲۴۵ بیماران بستری مراقبت‌های ویژه داشتند گزارش کردند که ۷۰ ایزوله استاف اورئوس جداسازی شده که ۷۱/۴درصد از این ایزوله‌ها دارای مقاومت چندگانه دارویی بوده‌اند. همچنین با بررسی ملکولی ژن‌های ادهزین استاف اورئوس‌های جداسازی شده مشخص شد که میزان فراوانی ژن‌های *fnbB, fnbA, clfB, clfA* به ترتیب ۷۸/۶درصد، ۷۴/۳درصد، ۷۵/۷درصد، ۱۰۰درصد بوده که با توجه به بالا بودن فراوانی ژن‌های ادهزین میزان مرگ و میر در بخش–های مراقبت‌های ویژه بیمارستانی با این باکتری افزایش می‌یابد(۲۵).

در مطالعه حاضر، از ۳۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از مواد غذایی، تعداد ۲۳ سویه (۷۶/۶۶درصد) دارای ژن *clfB*، ۲۴ سویه (۸۰درصد) حاوی ژن *clfA* ، ۱۵ سویه (۵۰درصد) دارای ژن *fib*، ۶ سویه (۲۰درصد) واجد ژن *fnbB* بوده‌اند. ژن *fnbA* در هیچ یک از نمونه‌ها شناسایی نشد. از میان ۳۰ نمونه بالینی، تعداد ۲۱ سویه (۷۰درصد) دارای ژن *clfB*، ۲۸ سویه (۹۳/۳۳درصد) حاوی ژن *clfA*، ۱۰ سویه (۳۳/۳۳درصد) دارای ژن، ۲ سویه (۶/۶۶درصد) واجد ژن fnbB بوده‌اند. ژن fnbA در هیچ‌یک از نمونه‌ها شناسایی نشد. اغلب ایزوله‌ها قدرت تولید بیوفیلم حتی در حد ضعیف را دارا بوده که مشابه با نتایج حاصل از مطالعات ذکر شده است که علاوه بر تاکید بر تولید بیوفیلم بر افزایش میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های استاف اورئوس جداسازی شده نیز اشاره دارد. بیشترین میزان فراوانی مربوط به ژن fnbB بوده که مشابه با سایر مطالعات است. فعالیت عصاره اتانولی مرکبات روی S. Epidermidis و S. aureus نشان داد که سویه‌های استافیلوکوک دارای حساسیت متفاوت بودند که S. epidermidis حساسیت کمتری نسبت به استافیلوکوک‌های کوآگولاز مثبت دارند (۲۶).

## نتیجه‌گیری:

به نظر می‌رسد بیوفیلم و بیان فنوتیپی نسبت بالایی را داشته باشد و توانایی بالای این باکتری در تشکیل بیوفیلم می‌تواند در پیدایش عفونت‌های و ایجاد سویه‌های آنتی‌بیوتیکی چندگانه اهمیت ویژه‌ای داشته باشد. همچنین ارتباط قابلیت ژنتیکی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به لحاظ داشتن پروتئین‌های سطحی و فاکتور حدت (بیوفیلم) در اکثر سویه‌های مهاجم در غذا و نمونه‌های بالینی خطر جدی باشد.

## منابع:


. Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. Toxins. 2010;2(8):2177-97.

2. Evenson ML, Hinds MW, Bernstein RS, Bergdoll MS. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. Int J food Microbiol. 1988;7(4):311-6.

3. Do Carmo LS, Cummings C, Roberto Linardi V, Souza Dias R, Maria De Souza J, De Sena MJ, et al. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident. Foodborne Patho Dis. 2004;1(4):241-6.

4. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. Staphylococcus aureus and food poisoning. Genet Mol Res. 2003;2(1):63-76.

5. oles BR, Horswill AR. Agr-mediated dispersal of Staphylococcus aureus biofilms. PLoS Pathogens.2008;4(4):63-76.:e1000052.

6. Lauderdale KJ, Boles BR, Cheung AL, Horswill AR. Interconnections between Sigma B, agr, and proteolytic activity in Staphylococcus aureus biofilm maturation. Infect Immun. 2009;77(4):1623-35.

7. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology: Elsevier Health Sci. 2015.

8. Hedges LO, Maibaum L, Chandler D, Garrahan JP. De-coupling of exchange and persistence times in atomistic modelsof glass formers. Ernest Orlando Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA (US); 2007 Aug 15.

9. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. Inter J food Microbiol. 2000;61(1):1-10.

10. Holguín-Veras J, Patil GR. A multicommodity integrated freight origin–destination synthesis model. Networks and Spatial Economics. 2008;8(2):309-26.

11. Schlievert PM, Case LC, Nemeth KA, Davis CC, Sun Y, Qin W, et al. α and β chains of hemoglobin inhibit production of Staphylococcus aureus exotoxins. Biochem. 2007;46(50):14349-58.

12. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough L. Microtiter plate assay for assessment of Listeria monocytogenes biofilm formation. Appl Environ


[ Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17 ]

Microbiol. 2002;68(6):2950-8.
13. Nourbakhsh F, Momtaz H. Evaluation of Phenotypic and Genotypic Biofilm Formation in Staphylococcus aureus Isolates Isolated from Hospital Infections in Shahrekord, 2015. Evaluation. 2016;19(109):69-79. (In Persian)
14. Nazari-Shirkouhi S, Eivazy H, Ghodsi R, Rezaie K, Atashpaz-Gargari E. Solving the integrated product mix-outsourcing problem using the imperialist competitive algorithm. Expert Systems with Applications. 2010;37(12):7615-26. (In Persian)
15. Tristan A, Ying L, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. Use of multiplex PCR to identify Staphylococcus aureus adhesins involved in human hematogenous infections. J Clin Microbiol. 2003;41(9):4465-7.
16. Nezhad RR, Meybodi SM, Rezaee R, Goudarzi M, Fazeli M. Molecular Characterization and Resistance Profile of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus Strains Isolated from Hospitalized Patients in Intensive Care Unit, Tehran-Iran. Jundishapur J Microbiol. 2017;10(3):1-9.
17. Lina G, Boutite F, Tristan A, Bes M, Etienne J, Vandenesch F. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of staphylococcal agr alleles. Appl Environ Microbiol. 2003;69(1):18-23.
17. Chen K, Que L. Stereospecific alkane hydroxylation by non-heme iron catalysts: mechanistic evidence for an FeV O active species. J American Chem Soci. 2001;123(26):6327-37.
18. Dastmalchi saee H, Aghdasi S, Mohammadzadeh H. Characterization of trap types in Staphylococcus aureus isolates from mastitis bovine and ovine milk samples in the North West of Iran. J Iran Vet. 2013;9(1):19-29. (In Persian)
19. Christensen GD, Simpson W, Younger J, Baddour L, Barrett F, Melton D, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol. 1985;22(6):996-1006.
20. Khoramian B,Emaneini ME,Bolourchi M,Eslampour MA,-Niasari-Naslaji A, Aligholi M,Barin A,Sattari S,Hovareshti P. Evaluation of the biofilm-forming ability of Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis in Iran. J Comp Pathobiol. 2009;6(4):109-114. (In Persian)
21. Shojaei M, Karimi DH, Javadi A. Distribution of genes encoding biofilm production in S. aureus isolated from raw milk in Kurdistan. J Food Hygiene.2014;4(14):1-8. (In Persian)
22. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes forStaphylococcus aureus enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J Clin Microbiol. 2000;38(3):1032-5.
23. Zhang YQ, Ren SX, Li HL, Wang YX, Fu G, Yang J, et al. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming Staphylococcus epidermidis strain (ATCC 12228). Mol Microbiol. 2003;49(6):1577-93.
24. Eftekhar F, Rezaee R, Azad M, Azimi H, Goudarzi H, Goudarzi M. Distribution of adhesion and toxin genes in staphylococcus aureus strains recovered from hospitalized patients admitted to the ICU. Arch Pediatr Infect Dis. 2017;5(1):1-8.
25. Wojtyczka RD, Kępa M, Idzik D, Kubina R, Kabała-Dzik A, Dziedzic A, et al. In vitro antimicrobial activity of ethanolic extract of Polish propolis against biofilm forming Staphylococcus epidermidis strains. Evidence-Based Complemen Alternative Med. 2013;2013.

[ Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17 ]