

Evaluation of Phenotypic and Genotypic Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Isolates Isolated from Hospital Infections in Shahrekord, 2015

Fahimeh Nourbakhsh^{1*}, Hassan Momtaz²

1- MSc, Department of Microbiology, Branch of Shahrekord, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2- Professor, Department of Microbiology, Branch of Shahrekord, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Received: 23 Feb 2016, Accepted: 11 March 2016

Abstract

Background: Biofilm formation is one of the pathogenicity factors of *Staphylococcus aureus* that can help the bacteria to stick to the other surface and also increase antibiotic resistance pattern. This study aimed to investigate the phenotypic and genotypic indices for forming biofilm in *Staphylococcus aureus* isolates isolated from infectious samples.

Materials and Methods: 250 *Staphylococcus aureus* strains isolated from hospital infections were selected. Antibiotic resistance pattern was determined by using disk diffusion method. The ability of biofilm formation was investigated by molecular and phenotypic method.

Results: In this study, 73.5% of isolates were able to bind strongly, 5.33% had the ability of medium connection and 15.4% had the ability of weak connection in biofilm production. The frequency of *icaC* and *icaB* genes were 67.3% and 63.2%, respectively. 92.2% of biofilm producing isolates have *mecA* gene.

Conclusion: The spread of antibiotic resistance in isolates especially isolates that produce biofilm will create serious problems in the hospital therapeutic wards.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Shahrekord, Biofilm.

*Corresponding Author:

Address: Department of Microbiology, Islamic azad University of Shahrekord, Shahrekord, Iran.

Email: Fahimeh_nourbakhsh@yahoo.com

ارزیابی فنوتیپی و ژنوتیپی تشکیل بیوفیلم در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت های بیمارستانی شهر کرد در سال ۱۳۹۴

فهیمة نوربخش^{۱*}، حسن ممتاز^۲

۱- کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲- استاد، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: 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 حاضر با هدف بررسی شاخصه‌های فنوتیپی و ژنوتیپی تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های عفونی در استان شهرکرد انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: تعداد ۲۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی انتخاب گردید. جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی از روش انتشار دیسک استفاده شد. توان تشکیل بیوفیلم به روش مولکولی و فنوتیپی بررسی گردید.

یافته‌ها: در این بررسی، 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* ۶۷/۳ درصد و ژن *icaB* ۶۳/۲ درصد برآورد گردید. ۹۲/۲ درصد از ایزوله‌های مولد بیوفیلم واجد ژن *mecA* بودند.

نتیجه‌گیری: گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ویژه در ایزوله‌های مولد بیوفیلم مشکلات جدی در بخش‌های درمانی بیمارستان ایجاد خواهد کرد.

کلید واژگان: استافیلوکوکوس اورئوس، شهرکرد، بیوفیلم

* نویسنده مسئول: ایران، شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، گروه میکروب شناسی

Email: Fahimeh_nourbakhsh@yahoo.com

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس از مهم ترین عوامل عفونی در بیمارستان و جامعه به حساب می آید. این باکتری توانایی تولید توکسین های متعددی از جمله انتروتوکسین، پنتون والنتین و آگزوفولیاتیو توکسین را دارد (۱).

تشکیل بیوفیلم در ایزوله های باکتریایی جداسازی شده از بیماران استفاده کننده از ابزارهای خارجی، به ویژه بیماران بستری در بخش های ارتوپدی شایع تر می باشد (۲). بیوفیلم ساختاری متشکل از یک جمعیت باکتریایی است که به وسیله یک ماتریکس آگزوپلی مری تولید شده توسط باکتری محصور شده است. این ویژگی به باکتری توانایی اتصال به سطوح مختلف و هم چنین افزایش مقاومت ذاتی به آنتی بیوتیک ها را می دهد (۳). استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک پاتوژن بیمارستانی قابلیت تشکیل بیوفیلم و مزمن شدن بیماری در شخص آلوده را دارد. این باکتری توانایی اتصال به سطوح مختلف از قبیل ونتیلاتورهای مکانیکی، کاتتر و بافت های میزبان را دارا است (۴). گسترش آلودگی و هم چنین تشکیل بیوفیلم در تجهیزات و وسایل پزشکی منجر به افزایش عفونت های بیمارستانی شده و تلاش برای حذف این گونه آلودگی ها را ضروری ساخته است (۵).

تشکیل بیوفیلم، حساسیت به درمان های ضد میکروبی را کاهش می دهد که نهایتاً هزینه های درمانی بالایی برای بیماران به دنبال خواهد داشت. تولید بیوفیلم ناشی از فعالیت اپرنی تحت عنوان *icaABCD* می باشد که مهم ترین عامل برای تشکیل ماتریکس ایزوپلی ساکاریدی و از عوامل چسبندگی بین سلولی PIA است (۶).

ژن های *icaA*، *icaB*، *icaC* و *icaD* توسط سیستم های تنظیمی متعددی کنترل می شوند. این سیستم های تنظیمی شامل SarA و سیگما B (sig B) است (۷). علاوه بر سیستم اپرون *icaABCD*، سیستم *agr* نیز در ایجاد بیوفیلم نقش دارد (۸).

با توجه به شیوع بالای عفونت های بیمارستانی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس و هم چنین گسترش عوامل افزایش دهنده مقاومت، مطالعه حاضر با هدف مقایسه

سایر پژوهش های مرتبط در کشور و هم چنین بررسی توان تشکیل بیوفیلم و فراوانی حضور ژن های کد کننده پلی ساکاریدی چسبنده بین سلولی (ژن های *ica*) در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت های بیمارستانی در شهرستان شهرکرد انجام گرفت.

مواد و روش ها

ایزوله های باکتریایی: مطالعه حاضر که از نوع

مقطعی-توصیفی است، در نیمه دوم سال ۱۳۹۴ بر روی ۲۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از انواع عفونت های بیمارستانی در شهرستان شهرکرد شامل ۹۵ ایزوله جدا شده از زخم های چرکی، ۲۰ ایزوله از آبسه، ۵۵ ایزوله جدا شده از آسپیره تراشه، ۵۷ ایزوله از عفونت های خون، ۴ ایزوله از کاتتر، ۶ ایزوله جدا شده از موارد زخم بستر، ۳ ایزوله از مایع مفصلی و ۱۰ ایزوله از مایع مغزی نخاعی انجام گرفت. ایزوله های جدا شده با روش های استاندارد میکروبیولوژی نظیر رنگ آمیزی گرم، تست های کاتالاز و کوآگولاز، تخمیر قند مانیتول، حساسیت به دیسک نوویوسین، تست DNase (شرکت مرک، آلمان) مورد تأیید قرار گرفت. در این بررسی از استافیلوکوکوس اورئوس ATCC35556 به عنوان کنترل مثبت تولید کننده قوی بیوفیلم و از استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

سنجش فنوتیپی حساسیت آنتی بیوتیکی:

به منظور بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی از روش انتشار دیسک (Kirby-Bauer) استفاده گردید. از باکتری رشد کرده بر روی محیط بلاد آگار (به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد) جهت تهیه سوسپانسیون معادل لوله نیم مک فارلند استفاده شد. سوسپانسیون تهیه شده با استفاده از سواب استریل بر روی محیط مولر هیتون آگار فاقد نمک کشت داده شد. سپس آنتی بیوگرام هر ایزوله برای دیسک های آنتی بیوتیکی (پادتن طب) شامل دیسک های با غلظت استاندارد ونکومايسين (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، تری متوپریم

استافیلوکوکوس اورئوس غنی سازی شده بر روی محیط TSB (تریپتیکاز سوی براث) به محیط بلاد آگار کشت داده شد و جهت بررسی تولید بیوفیلم به روش فنوتیپی از محیط Congo Red agar (شرکت مرک، آلمان) حاوی ۴۰ گرم در لیتر سوکرز استفاده شد. در بررسی ایزوله‌ها، کلنی‌های سیاه رنگ به عنوان بیوفیلم قوی، کلنی‌های قرمز تیره بیوفیلم متوسط و کلنی‌های قرمز روشن به عنوان سویه‌های بیوفیلم منفی در نظر گرفته شدند. جهت بررسی با روش میکروپلیت تیتراسیون، نمونه‌های غنی شده کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای پلی استرین منتقل گشت و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شد (۱۴). چاهک‌ها چهار مرتبه با استفاده از فسفات بافر سالین (PBS) شست و شو داده شدند و سپس به طور کامل خشک گردیدند. در مرحله بعد، رنگ آمیزی باید انجام شود. جهت رنگ آمیزی چاهک‌ها از رنگ کریستال ویوله به مدت ۱۵ دقیقه در هر چاهک استفاده شد. سپس رنگ موجود در هر چاهک با استفاده از آب معمولی شست و شو داده شده و جهت آزاد سازی رنگ موجود در دیواره باکتری‌هایی که مولد بیوفیلم می‌باشند، ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپیل الکل ۱۰ درصد به اضافه‌ی اتانول ۷۰ درصد به هر چاهک اضافه گردید (۱۵، ۱۶).

در نهایت رنگ آزاد شده در هر چاهک در طول موج نوری ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه قرائت کننده الیزا (Elisa Reader stat fax 2100) بررسی شد. نمونه کنترل منفی در این روش، محیط TSB حاوی ۱ درصد گلوکز بود. جهت اطمینان از صحت کار برای ایزوله‌های مورد مطالعه ۳ مرتبه جذب نوری هر یک از ایزوله‌ها مورد بررسی قرار گرفت. روش محاسبه مقدار حد نصاب برای هر گروه در جدول ۱ ارائه شده است.

(۲/۵ میکروگرم)، تراسایکلین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، متی سیلین (۵ میکروگرم)، کانامایسین (۳۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، پنی سیلین (۱۰ میکروگرم)، ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، سفازولین (۳۰ میکروگرم)، سفالوتین (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، آزیترومایسین (۱۵ میکروگرم)، موپیروسین (۳۰ میکروگرم)، ریفاپیسین (۵ میکروگرم)، سفکسیتیم (۳۰ میکروگرم)، آمپی سیلین (۳۰ میکروگرم)، نیتروفورانتوئین (۳۰ میکروگرم) انجام گردید. جهت تعیین مقاومت دارویی ایزوله‌ها نسبت به متی‌سیلین از روش MIC (حداقل غلظت باز دارنده) با روش میکرودايلوشن براث و روش مولکولی جهت بررسی ژن *mecA* استفاده گردید (۱۰). در این روش رقت‌های متوالی از آنتی‌بیوتیک مورد نظر به همراه غلظت ثابتی از سوسپانسیون باکتری (با کدورت نیم مک فارلند) در میکروپلیت با هم مجاور شد. پس از مرحله گرماگذاری به مدت ۲۴ ساعت چگالی نوری در هر رقت بررسی شد. چاهک‌ها با استفاده از دستگاه الیزا ریدر بررسی و پایین‌ترین غلظتی از آنتی‌بیوتیک که مانع از رشد باکتری می‌گردید به عنوان MIC آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته شد (۱۱).

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حساسیت ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی مطابق با دستورالعمل CLSI (موسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی) و بر اساس قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها به صوت حساس، نیمه حساس و مقاوم بیان گردید (۱۲). سویه‌ی استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC3391 و ATCC25923 به عنوان سوش کنترل در این تحقیق استفاده شد (۱۳). تمامی محیط‌های کشت مورد استفاده در این مطالعه از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

بررسی تشکیل بیوفیلم به روش فنوتیپی: در

این مطالعه، جهت ارزیابی تولید بیوفیلم، کلنی‌های

جدول ۱. طبقه بندی توانایی تشکیل بیوفیلم به وسیله روش میکروتیتر بلیت

توانایی تشکیل بیوفیلم	محاسبه میزان حد نصاب	نتایج حاصل از میانگین حداکثر جذب نوری (OD)
قوی	$OD > 4 * ODC^2$	$OD > 0.332$
متوسط	$2 * ODC < OD \leq 4 * ODC$	$0.166 < OD \leq 0.332$
ضعیف	$OD < OD \leq 2 * ODC$	$0.083 < OD \leq 0.166$
عدم اتصال	$OD \leq 0.083$	$OD \leq 0.083$

OD: چگالی نوری
(کنترل منفی SD*3)+(میانگین کنترل منفی ODC:OD)

ارزیابی ژنوتیپی جهت شناسایی ژن های

icaABC: جهت ردیابی حضور ژن های *icaA* *icaB* *icaC*

icaD و *icaC* در ایزوله های مورد مطالعه از روش PCR

چند گانه ای با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۲ استفاده شد (۱۷).

جدول ۲. زوج پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی حضور ژن های *icaA* *icaB* *icaC* و *icaD*

ژن های هدف	توالی پرایمرها	اندازه محصول (جفت باز)
<i>icaA</i>	F: ACACCTTGCTGGCGCAGTCAA R: TCTGGAACCAACATCCAACA	۱۸۸
<i>icaB</i>	F: AGAATCGTGAAGTATAGAAAATT R: TCTAATCTTTTTCATGGAATCCGT	۹۰۰
<i>icaC</i>	F: ATGGGACGGATTCCATGAAAAAGA R: TAATAAGCATTAATGTTCAATT	۱۱۰۰
<i>icaD</i>	F: ATGGTCAAGCCCAGACAGAG R: AGTATTTCAATGTTTAAAGCAA	۱۹۸

ابتدا DNA ژنومی ایزوله های مورد نظر با استفاده از کیت استخراج DNA (ساخت شرکت سیناژن ایران) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10x و ۱۵۰ میکرومول dNTP، ۲ میلی مول MgCl₂، ۱۰ پیکومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم پلی مرز Taq DNA (فرمتاز، لیتوانی) و ۲ میکرولیتر از DNA مربوط به هر نمونه انجام گرفت. جهت انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر (اپندورف ماسترسایکلر، اپندورف نتل-Hinz GmbH، هامبورگ، آلمان) استفاده شد. برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از: یک سیکل ۹۵ درجه

سانتی گراد به مدت ۶ دقیقه، ۳۲ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه. با توجه مقاومت آنتی بیوتیکی بالا نسبت به آنتی بیوتیک متی سیلین، علاوه بر ارزیابی فنوتیپی به ارزیابی ژنوتیپی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی نیز پرداخته شد. جهت بررسی توزیع ژن کد کننده مقاومت به آنتی بیوتیک متی سیلین (ژن *mecA*) از زوج پرایمر ذکر شده در جدول ۳ استفاده شد.

جدول ۳. توالی پرایمر مورد استفاده جهت ردیابی ژن *mecA* در ایزوله های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس

ژن	توالی نوکلئوتیدی (۳' - ۵')	اندازه محصول
<i>MecA</i>	F: AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC R: AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	532 (bp)

مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها تعیین گردید.

یافته ها

در مطالعه حاضر ۲۵۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از انواع عفونت های بیمارستانی در مراکز درمانی استان شهرکرد مورد بررسی قرار گرفت. تمام ایزوله های زخم و زخم بستر مورد بررسی توان تولید بیوفیلم به روش فنوتیپی (میکرو پلیت تیتراسیون و کنگورد آگار) را در مقادیر مختلف دارا بودند.

در بررسی نهایی ایزوله های مولد بیوفیلم به روش فنوتیپی، ۷۳/۵ درصد از ایزوله ها توانایی اتصال قوی، ۵/۳۳ درصد از آنها توان اتصال متوسط و ۱۵/۴ درصد از ایزوله ها توانایی اتصال ضعیف و بقیه جز نمونه های مشکوک در تولید بیوفیلم طبقه بندی شدند. فراوانی حضور ژن *icaA* ۶۷/۳ درصد، ژن *icaB* ۶۳/۲ درصد، ژن *icaC* ۵۸/۳ درصد و ژن *icaD* ۵۹/۴ درصد برآورد گردید. فراوانی حضور ژن های مولد بیوفیلم در شکل ۱ نشان داده شده است.

در این مرحله، آزمایش PCR چند گانه ای در حجم ۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10x، ۱/۵ میلی مول MgCl₂، ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۰/۵ میکرومول از زوج پرایمرهای F و R، ۱ واحد آنزیم پلی مزاز Taq DNA و ۲/۵ میکرولیتر از DNA مربوط به هر ایزوله انجام شد. برنامه حرارتی مورد استفاده در این مرحله عبارت بود از: یک سیکل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۸ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه. برای مشاهده محصولات PCR از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد.

تحلیل آماری: داده های حاصل از نتایج با نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ و آزمون آماری کای مربع در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p < 0.05$) تحلیل شد و ارتباط آماری بین توان تشکیل بیوفیلم در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس با محل جداسازی ایزوله و الگوی



شکل ۱. فراوانی حضور ژن های مولد بیوفیلم (ژن های *icaD* *icaC* *icaB* *icaA*)

در این تصویر ستون های ۷ و ۱۰ نشان دهنده ی حضور ژن *icaC* با ۱۱۰۰ جفت باز، ستون های ۸ و ۹ نشان دهنده ی حضور ژن *icaB* با ۹۰۰ جفت باز، ستون شماره ۱ نشان دهنده ی کنترل منفی، ستون های ۲ و ۶ نشان گر حضور ژن *icaA* با ۱۸۸ جفت باز و ستون های ۳ تا ۵ نشان دهنده حضور ژن *icaD* با ۱۹۸ جفت باز می باشند.

جهت ارزیابی ژنوتیپی توان تولید بیوفیلم در ایزوله های مورد مطالعه از ردیابی ژن های *ica* به روش PCR چند گانه استفاده شد. در این میان ژن *icaC* شایع ترین ژن کد کننده تولید بیوفیلم در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه می باشد. هر چند که از نظر آماری اختلاف آماری معنی داری بین حضور این

میزان مقاومت به متی سیلین در نمونه های عفونی مورد مطالعه به روش دیسک دیفیوژن آگار در ۹۰ درصد از ایزوله ها مشاهده شد. جهت تأیید مقاومت به متی سیلین در ایزوله های مولد بیوفیلم، از روش PCR استفاده گردید که در این روش ۹۲/۲ درصد از ایزوله های مولد بیوفیلم واجد ژن *mecA* بودند.

اختلاف آماری معنی داری بین توان تشکیل بیوفیلم در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های زخم بستر و زخم های چرکی با این فاکتور در ایزوله های جدا شده از موارد آبه، مایع مغزی-نخاعی و مایع مفصلی در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p=0/045$) با آزمون کای مربع مشاهده شد.

جدول ۴. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه

درصد نمونه های حساس	درصد نمونه های نیمه حساس	درصد نمونه های مقاوم	آنتی بیوتیک
۴۵/۱	۱۵/۹	۳۹	سفکستیم
۵۲	۲۹	۱۹	ریفامپسین
۳۴/۸	۳۷	۲۸/۲	موپیروسین
۲۵	۱۰	۶۵	آزیترومایسین
۱۱/۸	۳۴/۲	۵۴	کلیندامایسین
۱۴/۱	۲۱	۶۴/۹	سفترباکسون
۴۸	۲۷	۲۵	سفالوتین
۱۴	۲۱	۶۵	سفازولین
۱۶/۵	۱۹	۶۴/۵	ایمی پنم
۵	۷	۸۸	پنی سیلین
۴۴	۱۳	۴۳	کلرامفنیکل
۱۳/۷	۳۲	۵۴/۳	کانامایسین
۰	۱۰	۹۰	متی سیلین
۱/۷	۸/۶	۸۹/۷	اریترومایسین
۱۲/۲	۱۲	۷۵/۸	جنتامایسین
۱۱/۹	۵/۷	۸۲/۴	تتراسایکلین
۳۷	۳۴	۲۹	تری متوپریم
۵/۹	۴/۶	۸۹/۵	سیپروفلوکساسین
۱۵/۸	۲۱/۲	۶۳	آمی سیلین
۸۶/۹	۵/۱	۸	ونکومایسین
۵۳/۶	۳۴/۴	۱۲	نیتروفورانئوتین

چهار ژن در استافیلوکوکوس اورئوس با همدیگر وجود نداشت ($p=0/821$)، اما در تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات، اختلاف آماری معنی داری بین توان تشکیل بیوفیلم در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های زخم بستر و زخم های چرکی با این فاکتور در ایزوله های جدا شده از موارد آبه، مایع مغزی-نخاعی و مایع مفصلی در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p=0/045$) با آزمون کای مربع مشاهده شد.

ارزیابی فنوتیپی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سوبه های استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک های متی سیلین (۹۰ درصد)، اریترومایسین (۸۹/۷ درصد)، سیپروفلوکساسین (۸۹/۵ درصد)، پنی سیلین (۸۸ درصد)، تتراسایکلین (۸۲/۴ درصد)، جنتامایسین (۷۵/۸ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های نیتروفورانئوتین و ونکومایسین وجود دارد. در تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات مربوط به مقاومت آنتی بیوتیکی با آزمون کای مربع، اختلاف آماری معنی داری بین مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیوتیک های متی سیلین، اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، پنی سیلین، تتراسایکلین و جنتامایسین با مقاومت آن ها به آنتی بیوتیک های ونکومایسین، نیتروفورانئوتین و ریفامپسین در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p=0/029$) مشاهده شد. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه در جدول ۴ ارائه شده است.

بحث

از اهداف این مطالعه بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و هم چنین بررسی توان تولید بیوفیلم در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس به روش فنوتیپی و ژنوتیپی می باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که توانایی تشکیل بیوفیلم با استفاده از برخی شاخص های فنوتیپی و ژنوتیپی، با گسترش مقاومت های آنتی بیوتیکی به ویژه مقاومت به متی سیلین در نمونه های عفونی مرتبط می باشد. با توجه به تشکیل واحدهای چندلایه در ایجاد ساختارهای

از میان نمونه های عفونی مورد مطالعه، ۹۵ مورد از نمونه های زخم و زخم بستر نسبت به همه ی آنتی بیوتیک ها مقاوم بودند. آنتی بیوتیک پیشنهادی برای این ایزوله ها ونکومایسین، نیتروفورانئوتین، ریفامپین، تری متوپریم و سفالوتین بود که این مساله نشان دهنده گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی در نمونه های عفونی به ویژه مقاومت های چندگانه است. همه ی نمونه های استافیلوکوکوس اورئوس توانایی تشکیل بیوفیلم در مقادیر مختلف را داشتند. در تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات مربوط به این جدول،

اورئوس تمامی ایزوله‌ها قدرت تولید بیوفیلیم حتی تا حد ضعیف را دارا می‌باشند که مشابه با نتایج حاصل از مطالعه کافیسو و همکاران در سال ۲۰۰۷، علاوه بر تأکید بر تولید بیوفیلیم بر افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در نمونه‌های عفونی نیز اشاره دارد (۲۲).

استافیلوکوکوس اورئوس از جمله باکتری‌هایی است که در بخش‌های مراقبت‌های ویژه بیمارستان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و هم‌چنین با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری و نیز توانایی بالای این باکتری در تشکیل بیوفیلیم می‌تواند در پیدایش عفونت‌های مزمن و هم‌چنین ایجاد سویه‌های آنتی‌بیوتیکی چندگانه اهمیت ویژه‌ای داشته باشد. گسترش نمونه‌های بالینی مولد بیوفیلیم با مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی چندگانه به عنوان خطر جدی برای بیماران محسوب شده و می‌تواند باعث افزایش موارد مرگ و میر در بیمارستان‌ها گردد (۲۳).

با توجه به ساختار و مکانیسم‌های ویژه در تشکیل بیوفیلیم، علاوه بر عدم نفوذ عوامل ضد باکتریایی، آلودگی ابزارهای درمانی و پزشکی نیز می‌تواند در ایجاد شرایط بحرانی و راه‌های انتقال عفونت موثر باشد.

در سال ۲۰۰۹ طی مطالعاتی که در کشور هلند توسط کروز و همکاران انجام گرفت، علاوه بر تأکید در مورد گسترش مقاومت‌های چندگانه در نمونه‌های عفونی بر توانایی تولید بیوفیلیم در ۶۰ درصد از ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* اشاره شد (۲۴).

در مطالعات ذکر شده جهت تشخیص قدرت نمونه‌های عفونی در تولید بیوفیلیم علاوه بر در نظر گرفتن روش‌های ژنتیکی، از روش‌های کشت روی محیط کنگورد آگار نیز استفاده شده است. در مطالعه حاضر علاوه بر در نظر گرفتن تمام روش‌های موجود در مطالعات قبل از روش مولکولی جهت مطالعه ردیابی ژن‌های موجود در اپران *ica* استفاده و به بررسی توانایی تشکیل بیوفیلیم با استفاده از روش میکروپلیت تیتراسیون و کشت در محیط کنگورد آگار نیز پرداخته شد که ۷۳/۵ درصد از ایزوله‌ها توانایی اتصال قوی، ۵/۳۳ درصد از آن‌ها توان اتصال متوسط، ۱۵/۴ درصد از

بیوفیلیم، می‌توان گسترش نمونه‌های بیوفیلیمی را به عنوان مرحله کلیدی و شاخص در افزایش عفونت و هم‌چنین گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در نظر گرفت (۱۸).

مطالعات مختلفی در ایران و جهان در زمینه بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی انجام گرفته است. با توجه به تفاوت در الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بسته به مناطق جغرافیایی مختلف، می‌توان *استافیلوکوکوس اورئوس* را به عنوان یک عامل عفونی گسترده با الگوی مقاومتی بالا در سطح بیمارستان‌ها مطرح نمود که با تغییر شرایط جغرافیایی و منطقه بررسی می‌توان الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی متنوعی را ارائه کرد (۱۹).

در سال ۱۹۹۵ برای اولین بار از روش کالری‌متری جهت بررسی تشکیل بیوفیلیم استفاده شد. با این روش میزان چسبندگی نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به سطوح مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه که توسط کریس تنس و همکاران انجام گرفت، توانایی تولید بیوفیلیم با به کارگیری رنگ کریستال ویوله مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۰).

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۰ که توسط ووانگ و همکاران در آلمان انجام شد، ۷۸ درصد از ایزوله‌های عفونی *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه به عنوان نمونه‌های مولد بیوفیلیم گزارش شدند که این آمار مشابه نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان دهنده‌ی میزان بالای نمونه‌های مولد بیوفیلیم در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. تمام ایزوله‌های مورد بررسی توان تولید بیوفیلیم را در مقادیر مختلف دارا بودند که در این میان ۷۳/۵ درصد از ایزوله‌ها توانایی اتصال قوی، ۵/۳۳ درصد توان اتصال متوسط و ۱۵/۴ درصد از ایزوله‌ها توانایی اتصال ضعیف را در تولید بیوفیلیم نشان دادند. فراوانی حضور ژن *icaC* ۶۷/۳ درصد و ژن *icaB* ۶۳/۲ درصد برآورد گردید. نتایج حاصل از این مطالعه، مشابه با آمار ارائه شده توسط ووانگ و همکاران، بیان‌گر شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های مولد بیوفیلیم می‌باشد (۲۱).

در مطالعه حاضر، از ۲۵۰ ایزوله *استافیلوکوکوس*

icaC ۶۷/۳ درصد و ژن *icaB* ۶۳/۲ درصد برآورد گردید. ۹۲/۲ درصد از ایزوله‌های مولد بیوفیلم واجد ژن مقاومت به متی‌سیلین (*mecA*) بودند و میزان مقاومت به متی‌سیلین به روش فنوتیپی در ۲۵۰ نمونه‌ی عفونی جداسازی شده از مراکز درمانی شهرکرد در ۹۰ درصد از ایزوله‌ها گزارش شد که آمار بالاتری نسبت به ایزوله‌های مولد بیوفیلم در مطالعه‌های مشابه دارد (۲۴).

از سال ۱۹۵۰، آنتی‌بیوتیک ونکومايسين به عنوان یکی از آنتی‌بیوتیک‌های درمانی استافیلوکوکوس معرفی شده است. استفاده از این آنتی‌بیوتیک در درمان نمونه‌های MRSA موجب شروع مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها به این آنتی‌بیوتیک شده است، به طوری که اولین سویه مقاوم در سال ۱۹۹۸ در ژاپن گزارش شد.

در بررسی حاضر، کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به ونکومايسين با ۸ درصد مقاومت گزارش شده است که نتایج حاضر مشابه با نتایج احمدی و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی نمونه‌های بالینی جداسازی شده از مرکز درمانی کرمانشاه می‌باشد. در این مطالعه بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به پنی‌سیلین (۱۰۰ درصد) و تتراسایکلین (۷۶ درصد) گزارش شده است. در این بررسی کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای نیتروفوراتوئین (۸ درصد) و ونکومايسين (۱۴ درصد) برآورد شده است (۲۵).

نتایج حاضر مشابه با مطالعه کیانی نیا و همکاران در شمال غرب کشور در سال ۲۰۱۳ می‌باشد. در این بررسی میزان مقاومت به ونکومايسين ۱۲ درصد گزارش شد (۲۶).

شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین گاه‌ها به دلیل بیان ناهمگن مقاومت پیچیده می‌باشد و تحت تأثیر متغیرهایی مثل pH، دما و غلظت نمک است. سویه‌هایی که بر طبق روش فنوتیپی مقاوم به متی‌سیلین هستند، درصد کمی ژن *mecA* را حمل می‌کنند. این تفاوت‌ها ناشی از توزیع متفاوت این ژن در مکان‌های گوناگون، روش بیان آن‌ها و هم‌چنین متفاوت بودن مکان‌های نمونه‌گیری است. در مطالعه حاضر، ۹۲/۲ درصد

ایزوله‌ها توانایی اتصال ضعیف و بقیه جز نمونه‌های مشکوک در تولید بیوفیلم طبقه‌بندی شدند. فراوانی حضور ژن *icaC* ۶۷/۳ درصد، ژن *icaB* ۶۳/۲ درصد، ژن *icaA* ۵۸/۳ درصد و ژن *icaD* ۵۹/۴ درصد برآورد گردید. نتایج هر دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی به توان تولید بیوفیلم در ایزوله‌های جداسازی شده اشاره دارد.

تفاوت بین خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی در ایزوله‌های مورد بررسی در مناطق مختلف، علاوه بر شرایط فیزیولوژی متفاوت در ایزوله‌های بالینی به منشأ ژنتیکی متفاوت آن‌ها نیز بستگی دارد. از این رو، حضور یک ژن به تنهایی تأییدی بر تشکیل بیوفیلم در باکتری نمی‌باشد. مشابه مطالعه حاضر، گزارشات متعددی در مورد ارتباط بین روش فنوتیپی مانند میکروپلیت تیتراسیون و حضور ژن‌های *ica* در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده در نقاط مختلف جهان منتشر شده است (۲۵).

با توجه به تفاوت‌های موجود در میزان تولید بیوفیلم در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس و با در نظر گرفتن شرایط اتیولوژیک متفاوت در ایجاد بیوفیلم، مطالعات گسترده‌ای در این زمینه در کشورمان انجام شده است. در سال ۲۰۱۱، مطالعه‌ای توسط افتخار و همکاران بر روی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس انجام گرفت که از این میان ۷۳ درصد از جدایه‌های عفونی مورد مطالعه واجد ژن *icaA* و *icaB* بودند (۲۳).

هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط نامور و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام گردید، از ۶۰ جدایه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس تمامی نمونه‌ها دارای ژن *icaC* بودند. در این مطالعه از روش فنوتیپی با استفاده از میکروپلیت تیتراسیون و کشت بر محیط کنگورد آگار استفاده گردید که ۶۵ درصد از ایزوله از نظر فنوتیپی مولد بیوفیلم قوی بودند. در مطالعه حاضر تمام ایزوله‌های مورد بررسی توان تولید بیوفیلم را در مقادیر مختلف دارا بودند که در این میان ۷۳/۵ درصد از ایزوله‌ها توانایی اتصال قوی، ۵/۳۳ درصد از آن‌ها توان اتصال متوسط و ۱۵/۴ درصد از ایزوله‌ها توانایی اتصال ضعیف را در تولید بیوفیلم نشان دادند. فراوانی حضور ژن

mecA genes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. International Journal of Health and Rehabilitation Sciences (IJHRS). 2012;1(2):64-8.

5. Miller PJ, Farland AM, Knovich MA, Batt KM, Owen J. Successful treatment of intravenously abused oral Opana ER-induced thrombotic microangiopathy without plasma exchange. American journal of hematology. 2014; 89(7): 695-7.

6. Atshan SS, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Lung LTT, Hamat RA, Karunanidhi A, et al. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. BioMed Research International. 2012; 2012.

7. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. Virulence. 2011; 2(5):445-59.

8. Mirzaee M, Najar Peerayeh S, Ghasemian A-M. Detection of *icaABCD* genes and biofilm formation in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Iranian Journal of Pathology. 2014; 9(4):257-62.

9. Vuong C, Saenz HL, Götz F, Otto M. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. Journal of Infectious Diseases. 2000; 182(6): 1688-93.

10. Li L, Yang H-j, cheng Liu D, He H-b, Wang C-f, Zhong J-f, et al. Analysis of biofilms formation and associated genes detection in *staphylococcus* isolates from bovine mastitis. International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine. 2012; 10(1):62-3.

11. Rahimi-Alang S, Asmar M, Cheraghali F, Yazarlou S, Amini A, Shakeri F, et al. Frequency of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in health care. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2011; 13(1): 17-22. [Persian]

12. Rahimi F, Karimi S. Antibiotic resistance pattern and prophage typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains Isolated from chicken husbandries in Tehran. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2013; 18(62):17-22. [Persian]

13. NCCLS. Performance standards for

از ایزوله‌های مولد بیوفیلم واجد ژن *mecA* بودند که این نتایج مشابه با مطالعه احمدی و همکاران است. این مطالعه به شیوع ۸۹ درصدی ژن *mecA* در ایزوله‌های زخم مورد مطالعه اشاره دارد (۲۸).

نتیجه گیری

با توجه به اهمیت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان یک پاتوژن بیمارستانی و با توجه به افزایش روز افزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های بالینی به منظور پیش‌گیری از تشکیل بیوفیلم و کلونیزه شدن باکتری در ابزار و محیط بیمارستان، رعایت استریلیزاسیون مناسب در ابزارهای درمانی مرتبط با بیمار، جهت جلوگیری از انتقال عفونت و هم‌چنین تشکیل بیوفیلم توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از طرح تحقیقاتی در دانشگاه آزاد اسلامی (به شماره‌ی ۹۴/۴۶۷۰) است که با همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام گرفته است. نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت پژوهشی و پرسنل محترم بیمارستان‌های مورد مطالعه در شهرکرد اعلام می‌نمایند.

منابع

1. Al-Ruaily MA, Khalil OM. Detection of (*mecA*) gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at Prince a/Rhman Sidery hospital, al-Jouf, Saudi Arabia. Journal of Medical Genetics and Genomics. 2011; 3(3):41-5.
2. Darabi N, Habibollahi H, Shahbaban K. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Isolated from patients and personnel in Army hospital. 2010; 8(3): 193-9. [Persian]
3. Duran N, Ozer B, Duran GG, Onlen Y, Demir C. Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. The Indian journal of medical research. 2012; 135(3): 389-96.
4. Sajith Khan A, Shetty PJ, Lakshmi Sarayu Y, Chidambaram A, Ranganathan R. Detection of

antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard. 2012.

14. Ikonomidis A, Vasdeki A, Kristo I, Maniatis AN, Tsakris A, Malizos KN, et al. Association of biofilm formation and methicillin-resistance with accessory gene regulator (agr) loci in Greek *Staphylococcus aureus* clones. *Microbial pathogenesis*. 2009; 47(6):341-4.

15. Bibalan MH, Shakeri F, Javid N, Ghaemi A, Ghaemi EA. Accessory gene regulator types of *Staphylococcus aureus* isolated in Gorgan, North of Iran. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014; 8(4):7-9.

16. Cucarella C, Tormo MÁ, Knecht E, Amorena B, Lasa I, Foster TJ, et al. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infection and immunity*. 2002; 70(6):3180-6.

17. Vancraeynest D, Hermans K, Haesebrouck F. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. *Veterinary microbiology*. 2004; 103(3): 241-7.

18. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Prophage and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Iran. *Archives of virology*. 2012; 157(9):1807-11.

19. Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, et al. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2010; 9(1): 23-4.

20. 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. *Journal of clinical microbiology*. 1985; 22(6):996-1006.

21. Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Demelio V, Spina D, Nicoletti G, et al. agr-Genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2007; 51(1):220-7.

22. Croes S, Deurenberg RH, Boumans M-LL, Beisser PS, Neef C, Stobberingh EE. *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. *BMC microbiology*. 2009; 9(1):1-2.

23. Eftekhari F, Dadaei T. Biofilm formation and detection of icaAB genes in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of basic medical sciences*. 2011; 14(2):132-6.

24. Namvar AE, Asghari B, Ezzatifar F, Azizi G, Lari AR. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *GMS hygiene and infection control*. 2013; 8(1).

25. Ahmadi Z, Tajbakhsh E, Momtaz H. Detection of the antibiotic resistance pattern in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples obtained from patients hospitalised in Imam Reza hospital, Kermanshah. *Journal of Microbial World*. 2014.

26. Nia MK, Hasani A, Hasani A, Sharifi Y, Ahmadi SM, Deghani L. Investigation and Identification of the nuc, fem B mecA and aac (6')/aph (2'')-Ia Genes in the *Staphylococcus Aureus* Isolated from Northwest Iran by Multiplex PCR Method. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services*. 2013; 35(1):68-73.[Persian]