فراوانی تشکیل بیوفیلم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در تهران در سالهای ۱۴۰۱-۱۳۹۹

فاتح رحیمی[1*]، علی قاسمی[2]

۱- دکتری تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۲- دکتری تخصصی میکروبیولوژی، استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان
*نشانی برای مکاتبه: f.rahimi@sci.ui.ac.ir

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از جمله عوامل غیرمعمول ایجاد عفونتهای دستگاه ادراری در بیمارستان و جامعه محسوب می شود، و به عنوان یکی از عوامل بیماریزای اصلی ایجاد عفونتهای مزمن شناخته می شود که این امر عمدتاً ناشی از توانایی تشکیل بیوفیلم می باشد. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی تشکیل بیوفیلم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری در شهر تهران به انجام رسیده است.*

روش کار: *در طی سالهای ۱۴۰۱-۱۳۹۹ در مجموع ۵۱۹ ایزوله مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری از آزمایشگاه یک بیمارستان در شهر تهران جداسازی گردید و با استفاده از آزمون PCR و پرایمرهای اختصاصی ژن nucA مورد شناسایی و تأیید قرار گرفتند. جهت تعیین مقاومت سویه ها به متی سیلین از ترکیبی از روشهای غربالگری آگار (واجد اگزاسیلین)، انتشار دیسک سفوکسی تین (۳۰ میکروگرم) و پرایمرهای اختصاصی ژنهای mecA و mecC استفاده گردید. همچنین، به منظور توانایی تشکیل بیوفیلم در میان سویه های مقاوم به متی سیلین از روشهای کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت استفاده گردید. برای تایپینگ سویه ها روشهای پروفاژ تایپینگ و SCCmec تایپینگ با آزمونهای multiplex-PCR جداگانه مورد استفاده قرار گرفتند.*

یافته ها: *در مجموع ۹۲ درصد سویه ها به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد تأیید قرار گرفتند و در نهایت ۱۳۴ سویه (۲۸ درصد) مقاوم به سفوکسی تین و واجد ژن mecA به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین انتخاب شدند. در آزمون ژلوز قرمز کنگو، ۵۵ سویه (۴۱ درصد) اسلایم مثبت بودند و در مجموع ۷۸ درصد سویه ها قادر به تشکیل بیوفیلم بودند. سیزده درصد سویه ها واجد SCCmec تایپهای IVa و V بودند و به عنوان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه معرفی شدند. همچنین، ۴ الگوی پروفاژی و ۵ پروفاژ تایپ در میان سویه ها شناسایی شدند که پروفاژ تایپ SGF و ساب تایپهای SGFa و SGFb به عنوان تایپهای غالب تعیین گردیدند. علاوه بر این، الگوی پروفاژی شماره ۳ (پروفاژ تایپهای SGB، SGF، SGFa و SGFb) فراوانترین الگو بود. تمامی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه واجد پروفاژ تایپهای SGA و SGL بودند.*

نتیجه گیری: *نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده فراوانی بالای تولید بیوفیلم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین واجد پروفاژ تایپهای مختلف در بیماران مبتلا به عفونت ادراری در شهر تهران است. توانایی بالقوه تولید طیف وسیعی از عوامل حدت، تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی بیوتیکی منجر به ظهور باکتریهای بیماریزای بسیار خطرناکی خواهد شد؛ که مؤید اهمیت گسترش بیشتر نظارت بر مراقبتهای بهداشتی و کنترل عفونت در بیمارستانها می باشد.*

کلمات کلیدی: عفونت ادراری، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، بیوفیلم، پروفاژ تایپ، SCCmec تایپ

مقدمه

سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* یک عامل تهدید کننده جهانی برای سلامت انسان محسوب می شوند که باعث ایجاد انواع مختلفی عفونتها شامل آبسه، اندوکاردیت، عفونت ادراری، سندرم شوک سمی و سپسیس می‌شوند (۱). عفونتهای ادراری از جمله رایجترین عفونتهای باکتریایی به شمار می روند که افراد در تمامی سنین به این عفونت مبتلا می شوند و آمار سالیانه ابتلای ۱۵۰ میلیون نفر به این عفونت در جهان حاکی از تحمیل هزینه های هنگفت اقتصادی به بیماران و سیستمهای بهداشتی می باشد (۲). همچنین، عفونت ادراری به عنوان یکی از علل مهم مرگ و میر نوزادان، زنان و مردان در سنین بالا شناخته می شود و عواقب جدی آن شامل عود مکرر عفونت، سپسیس و آسیب کلیه ها می باشد (۳). به طور کلی عفونتهای ادراری به ۲ دسته عفونتهای پیچیده و غیرپیچیده تقسیم بندی می شوند. عفونتهای غیرپیچیده شامل التهاب مثانه و التهاب کلیه است و معمولا در افراد سالم مشاهده می شود؛ اما عفونتهای پیچیده بیشتر مرتبط با بدخیمیها و انسداد دستگاه ادراری و استفاده از ابزارهای خارجی از قبیل سوند در مجرا می باشد (۴).

استافیلوکوکوس اورئوس از جمله باکتریهای بسیار مهم ایجاد عفونت ادراری شناخته می شود که عفونتهای ناشی از این باکتری به دلیل عدم شناسایی صحیح و انتخاب راهکار درمانی نامناسب منجر به عفونتهای عودشونده می شوند که ریشه کنی این عفونتها به یکی از چالشهای مهم درمانی در جهان تبدیل شده است (۵). از جمله دلایل عود عفونت تشکیل بیوفیلم توسط سویه ها می باشد که به عنوان یک جمعیت سازمان یافته از سلولهای باکتریایی شناخته می شوند که به سطوح زنده یا غیرزنده متصل هستند و در یک ماتریکس پلیمری محصور شده اند (۳). تشکیل بیوفیلم منجر به افزایش مقاومت باکتریها در برابر آنتی بیوتیکها و شرایط نامساعد محیطی، افزایش امکان تبادل DNA، تسهیل دسترسی باکتری به مواد غذایی و فرار از سیستم ایمنی میزبان می شود. *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد طیف وسیعی از عوامل بیماریزایی مختلف است که در کنار توانایی بالای این باکتری در کسب مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای مختلف این باکتری را به خطرناکترین و مقاومترین باکتری بیماریزای گرم مثبت مبدل نموده است که سالیانه منجر به مرگ و میر فراوانی در جهان می شود (۶, ۷). متی سیلین از جمله آنتی بیوتیکهایی است که نخستین بار جهت درمان عفونتهای ناشی از سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به پنی سیلین مورد استفاده قرار گرفت و اکنون کلونهای مختلفی که از سویه های مقاوم به متی سیلین در سراسر جهان منتشر شده اند به یکی از چالشهای بهداشتی در کشورهای مختلف تبدیل شده است (۱). مقاومت به متی سیلین ناشی از حضور ژنهای *mec*A و همچنین *mec*C می باشد که باعث تبدیل PBP2 به ساختار غیرعادی 'PBP2 می شود. این ژنها بخشی از یک عنصر ژنتیکی متحرک و بزرگ هستند که به عنوان کاست کروموزومی ژن *mec* استافیلوکوکی SCC*mec* شناخته می شوند. تا این لحظه ۱۳ تایپ مختلف SCC*mec* در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین شناسایی شده اند که بر این اساس سویه ها مقاوم به متی سیلین به انواع اکتسابی از بیمارستان (HA-MRS)، اکتسابی از جامعه (CA-MRSA) و مرتبط با دام (LA-MRSA) تقسیم بندی شده اند (۸, ۹).

این مطالعه با هدف بررسی فراوانی تشکیل بیوفیلم در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به یک مرکز درمانی در شهر تهران در بازه زمانی سالهای ۱۴۰۱-۱۳۹۹به انجام رسیده است.

مواد و روش‌ها

جمع آوری و شناسایی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس

جهت انجام این مطالعه در بازه زمانی خرداد ۱۳۹۹ لغایت اردیبهشت ۱۴۰۱ (۳۶ ماه) در مجموع ۵۱۹ ایزوله مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* از بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به آزمایشگاه یک بیمارستان خصوصی در شهر تهران جمع آوری گردید و به صورت هفتگی به آزمایشگاه

باکتری شناسی دانشگاه اصفهان منتقل شدند. تمامی ایزوله ها از بیماران با علائم اولیه کدورت، سوزش و تکرر ادرار، بعضا هماچوری و گاها تب جداسازی شدند. تمامی ایزوله ها که در آزمایشگاه بیمارستان به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد شناسایی قرار گرفته بودند در ابتدا بر روی محیط کلمبیا آگار (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) کشت داده شدند و سپس ایزوله های خالص در محیط مغذی واجد ۵۰ درصد گلیسرول در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شدند. جهت شناسایی و تشخیص قطعی ایزوله ها از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *nuc*A استفاده گردید (۱).

بررسی مقاومت نسبت به متی سیلین

به منظور تعیین مقاومت ایزوله ها نسبت به متی سیلین ابتدا از آزمون غربالگری آگار با محیط مولر هینتون (Scharlau, Spain) آگار واجد ۶ میکروگرم/میلی لیتر سفوکسی تین بر اساس دستورالعمل CLSI استفاده شده (۱۰). برای این منظور هر ایزوله باکتریایی بر روی محیط واجد سفوکسی تین کشت داده شد و سویه هایی که بر روی محیط امکان رشد داشتند به عنوان سویه های مقاوم به متی سیلین انتخاب شدند. سپس، به منظور تأیید مقاومت از آزمون انتشار دیسک سفوکسی تین (۳۰ میکروگرم) (Rosco Diagnostica, Denmark) بر روی محیط مولر هینتون آگار بر اساس دستورالعمل CLSI استفاده شد و سویه های مقاوم به متی سیلین جهت تعیین حضور ژنهای *mec*A و *mec*C با استفاده پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند (۱, ۱۱).

بررسی تشکیل بیوفیلم

روش کیفی

جهت سنجش تولید اسلایم و بیوفیلم به روش کیفی در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از روش قرمز کنگو بر اساس دستورالعمل پیشین استفاده گردید (۳). برای این منظور، در ابتدا از کشت تازه و خالص هر سویه یک کلنی انتخاب و به صورت خطی بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو کشت داده شد. سپس، پلیتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و در ادامه نیز به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. تعیین سویه های بیوفیلم منفی، بیوفیلم مشکوک و بیوفیلم مثبت به ترتیب با ظهور کلنیهای قرمز روشن، قرمز تیره و مشکی انجام گرفت.

روش کمی

جهت بررسی تشکیل بیوفیلم به روش کمی در میان سویه هایی که به روش قرمز کنگو به عنوان بیوفیلم مثبت و بیوفیلم مشکوک شناسایی شده بودند آزمون میکروتیتر پلیت بر اساس دستورالعمل پیشین مورد استفاده قرار گرفت (۳). برای این منظور، در ابتدا از کشت تازه و خالص سویه ها یک کلنی در محیط تریپتیک سوی براث (TSB, Scharlau, Spain) واجد ۰/۲۵ درصد گلوکز کشت داده شد و لوله های واجد باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و پس از تهیه کدورتی معادل 10^6 CFU/ml، ۲۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتری به صورت سه تایی در میکروپلیت ۹۶ خانه ای پلی استیرن تلقیح شدند. همچنین، از محیط کشت فاقد باکتری نیز به عنوان شاهد استفاده گردید و به صورت سه تایی در چاهکها تلقیح شدند. پلیتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شده و پس از سه مرتبه شست و شو با فسفات بافر سالین[۱] با استفاده از رنگ کریستال ویوله ۰/۳ درصد (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شده و پس از رنگبری با محلول اتانول:استن جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Stat Fax 2100, USA) مورد سنجش قرار گرفت. جهت تفسیر نتایج به ترتیب زیر عمل شد: بیوفیلم منفی: جذب نوری نمونه کمتر از جذب نوری شاهد، بیوفیلم ضعیف: جذب نوری نمونه کمتر از ۰/۲، بیوفیلم متوسط: جذب نوری نمونه بین ۱ تا ۰/۲، بیوفیلم قوی: جذب نوری نمونه بیشتر از ۱.

[۱] Phosphate-buffered saline (PBS)

آزمونهای مولکولی

استخراج DNA

در این مطالعه از روش جوشاندن جهت استخراج DNA از هر ایزوله باکتریایی استفاده گردید. بر اساس دستورالعمل پیشین رحیمی و همکاران (۸)، در ابتدا یک لوپ پر از کشت تازه و خالص هر ایزوله در یک میکروتیوب واجد ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل منتقل و به خوبی ورتکس گردید. سپس میکروتیوبها به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه ترموبلاک (HPN-24، پدیده نوژن پارس) در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در g × ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ یخچالدار (ARM-500، ارمغان طب ایرانیان) شدند. در نهایت از مایع رویی به عنوان الگوی DNA در آزمونهای PCR استفاده گردید.

شناسایی ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین

به منظور شناسایی ایزوله ها آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *nuc*A (جدول ۱، وزن باند مورد انتظار ۴۰۰ جفت باز) دستورالعمل و برنامه ارائه شده توسط رحیمی و همکاران مورد استفاده قرار گرفت (۸). همچنین، از آزمون PCR دیگری با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنهای *mec*A و *mec*C (جدول ۱، وزن باند مورد انتظار ۳۱۰ جفت باز) جهت تأیید سویه های مقاوم به متی سیلین بر اساس پروتکل معرفی شده پیشین استفاده گردید (۸).

SCC*mec* تایپینگ سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین

در این مطالعه بررسی وجود SCC*mec* تایپهای مختلف در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم با استفاده از یک آزمون multiplex-PCR و پرایمرهای اختصاصی (تایپهای I، II، III، IVa، IVb، IVc، IVd و V، جدول ۱) بر اساس برنامه ارائه شده پیشین انجام گرفت (۱۲).

پروفاژ تایپینگ سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین

جهت تعیین پروفاژتایپها (SGA، SGB، SGFa، SGFb، SGD و SGL) و الگوهای پروفاژی مختلف در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم از یک آزمون multiplex-PCR و پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) با استفاده از برنامه و دستورالعمل ارائه شده توسط Pantucek و همکاران استفاده گردید (۱۳).

تجزیه و تحلیل داده ها

به منظور انجام بررسیهای آماری و تجزیه و تحلیل داده های به دست آمده از آزمون Fisher's exact و نرم افزار GraphPad Prism 8 استفاده گردید.

جدول ۱- توالی پرایمرها و برنامه حرارتی مورد استفاده در آزمونهای PCR.

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه (جفت باز)	برنامه حرارتی
*nuc*A	F: 5′-AGTTCAGCAAATGCATCACA R: 5′-TAGCCAAGCCTTGACGAACT	400	94°C: 5 min, 30 cycles (94°C: 45 S, 62°C: 45 S, 72°C: 30 S), 72°C: 7 min
mecA	F: 5′-GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA R: 5′-CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA)	310	94°C: 10 min, 25 cycles (94°C: 45 S, 55°C: 45 S, 72°C: 105 S), 72°C: 8 min
mecC	F: 5′-TGAACGAAGCAACAGTACACC R: 5′- AGATCTTTTCCGTTTTCAGCCT	383	95°C: 5 min, 35 cycles (95°C: 45 S, 50°C: 45 S, 72°C: 1 min), 72°C: 2 min
SCC*mec* Type I	F: GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG R: GTCTCTCATAGTATGACGTCC	613	94°C: 5 min, 10 cycles (94°C: 45 S, 65°C: 45 S, 72°C: 90 S), 25 cycles (94°C: 45 S, 55°C: 45 S, 72°C: 90 S), 72°C: 10 min
SCC*mec* Type II	F: CGTTGAAGATGATGAAGCG R: CGAAATCAATGGTTAATGGACC	398	
SCC*mec* Type III	F: CCATATTGTGTACGATGCG R: CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG	280	
SCC*mec* Type IVa	F: GCCTTATTCGAAGAAACCG R: CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG	776	
SCC*mec* Type IVb	F: TCTGGAATTACTTCAGCTGC R: AAACAATATTGCTCTCCCTC	493	
SCC*mec* Type IVc	F: ACATATTTGTATTATCGGAGAGC R: TTGGTATGAGGTATTGCTGG	200	
SCC*mec* Type IVd	F: CTCAAAATACGGACCCCAATACA R: TGCTCCAGTAATTGCTAAAG	881	
SCC*mec* Type V	F: GAACATTGTTACTTAAATGAGCG R: TGAAAGTTGTACCCTTGACACC	325	
SGA	F: 5′-TATCAGGCGAGAATTAAGGG R: 5′-CTTTGACATGACATCCGCTTGAC	744	94°C: 10 min, 30 cycles (94°C: 1 min, 55°C: 90 S, 70°C: 90 S), 70°C: 10 min
SGB	F: 5′-ACTTATCCAGGTGGYGTTATTG R: 5′-TGTATTTAATTTCGCCGTTAGTG	405	
SGF	F: 5′-CGATGGACGGCTACACAGA R: 5′-TTGTTCAGAAACTTCCCAACCTG	155	
SGFa	F: 5′-TACGGGAAAATATTCGGAAG R: 5′-ATAATCCGCACCTCATTCCT	548	
SGFb	F: 5′-AGACACATTAAGTCGCACGATAG R: 5′-TCTTCTCTGGCACGGTCTCTT	147	
SGD	F: 5′-TGGGCTTCATTCTACGGTGA R: 5′-GTAATTTAATGAATCCACGAGAT	331	
SGL	F: 5′-GCTTAAAACAGTAACGGTGACAGTG R: 5′-TGCTACATCATCAAGAACACCTGG	748	

نتایج

شناسایی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین

بر اساس نتایج حاصل از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مشخص گردید که از مجموع ۵۱۹ ایزوله که در بیمارستان به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد شناسایی قرار گرفته بودند، ۴۷۸ سویه (۹۲ درصد) به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد تأیید قرار گرفتند و ۴۱ سویه (۸ درصد) متعلق به سایر گونه های جنس *استافیلوکوکوس* بودند که به اشتباه شناسایی شده بودند. همچنین، ۱۳۴ سویه (۲۸ درصد) نیز بر روی محیط مولر هینتون آگار واجد اگزاسیلین رشد کردند که همگی نسبت به دیسک سفوکسی تین مقاوم بوده و واجد ژن *mecA* نیز بودند که به عنوان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین انتخاب شدند. همانگونه که در جدول ۲ نشان داده شده است، ۵۶ سویه (۴۲ درصد) از آقایان و ۷۸ سویه (۵۸ درصد) نیز از خانمها جداسازی شدند. همچنین، بیشترین تعداد سویه ها متعلق به بیماران در بازه سنی ۷۹-۷۰ سال (۲۸ درصد) و سپس ۵۹-۵۰ سال (۲۱ درصد) و ۶۹-۶۰ سال (۲۰ درصد) بود.

جدل ۲- فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در میان خانمها و آقایان در بازه های سنی مختلف.

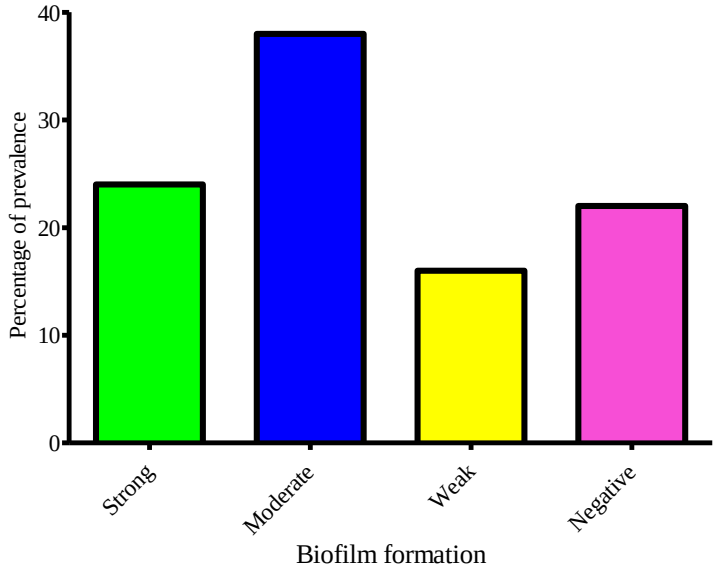
بازه سنی (سال)	آقایان (درصد)	خانمها (درصد)	مجموع (درصد)	*P* value
۱>	۱ (۲)	۰	۱ (۱)	۰.۴۹۷۵
۹-۱	۰	۱ (۱)	۱ (۱)	۱.۰۰۰۰
۱۹-۱۰	۱ (۲)	۴ (۵)	۵ (۴)	۰.۴۴۴۸
۲۹-۲۰	۲ (۴)	۲ (۳)	۴ (۳)	۱.۰۰۰۰
۳۹-۳۰	۲ (۴)	۷ (۹)	۹ (۷)	۰.۲۵۰۷
۴۹-۴۰	۱۱ (۲۰)	۹ (۱۲)	۲۰ (۱۵)	۰.۱۷۶۳
۵۹-۵۰	۸ (۱۴)	۲۱ (۲۷)	۲۹ (۲۱)	**۰.۰۳۴۷**
۶۹-۶۰	۱۶ (۲۹)	۱۱ (۱۴)	۲۷ (۲۰)	**۰.۰۱۵۳**
۷۹-۷۰	۱۵ (۲۷)	۲۳ (۲۹)	۳۸ (۲۸)	۰.۸۷۵۰
مجموع	۵۶ (۴۲)	۷۸ (۵۸)	۱۳۴	**۰.۰۳۳۶**

تعیین توانایی تولید بیوفیلم

از میان ۱۳۴ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین، ۱۶ سویه (۱۲ درصد) قادر به تشکیل اسلایم و بیوفیلم مثبت بودند و ۳۹ سویه (۲۹ درصد) نیز واجد کلنیهای قرمز تیره و بیوفیلم مشکوک بودند. همچنین، ۷۹ سویه (۵۹ درصد) نیز قادر به تشکیل اسلایم نبوده و به عنوان بیوفیلم منفی در نظر گرفته شدند. علاوه بر این، بر اساس نتایج بررسی توانایی کمی تولید بیوفیلم در سویه های بیوفیلم مثبت و بیوفیلم مشکوک، ۱۳ سویه (۲۴ درصد) مولد بیوفیلم قوی، ۲۱ سویه (۳۸ درصد) مولد بیوفیلم متوسط، ۹ سویه (۱۶ درصد) مولد بیوفیلم ضعیف و ۱۲ سویه (۲۲ درصد) نیز بیوفیلم منفی بودند (شکل ۱).

SCC*mec* تایپینگ سویه ها

بر اساس نتایج حاصل از آزمون PCR مشخص گردید که تمامی سویه های مقاوم به متی سیلین واجد ژن *mec*A بودند و بنابراین نیازی به بررسی حضور ژن *mec*C در میان ایزوله ها نبود. با این وجود نتایج حاصل از بررسی ژن *mec*C با استفاده از پرایمرهای اختصاصی نشان داد که تمامی سویه ها فاقد این ژن بودند. در این مطالعه ۳ سویه (۶ درصد) واجد SCC*mec* تایپ IVa و ۴ سویه (۷ درصد) نیز واجد SCC*mec* تایپ V بودند و به عنوان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* اکتسابی از جامعه شناسایی شدند. همچنین، ۴۸ سویه (۸۷ درصد) نیز به عنوان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* اکتسابی از بیمارستان طبقه بندی شدند؛ که تنها واجد SCC*mec* تایپ III بودند.



شکل ۱- درصد فراوانی تشکیل بیوفیلم در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین.

پروفاژ تایپینگ سویه ها

در این مطالعه در مجموع ۴ پروفاژ تایپ SGA (۷ سویه، ۱۳ درصد)، SGB (۴۳ سویه، ۷۸ درصد)، SGF (۵۵ سویه، ۱۰۰ درصد) و SGL (۷ سویه، ۱۳ درصد) و دو ساب تایپ SGFa و SGFb (۵۵ سویه، ۱۰۰ درصد) در میان سویه های مولد بیوفیلم شناسایی گردید (جدول ۲). پروفاژ تایپ SGF و ساب تایپهای SGFa و SGFb در تمامی ۵۵ سویه مولد بیوفیلم حاضر بودند و به عنوان تایپ غالب در در این مطالعه انتخاب شدند. علاوه بر این، هیچکدام از سویه ها نیز واجد پروفاژ تایپ SGD نبودند و فراوانی پروفاژ تایپهای SGA و SGL نیز محدود به ۱۳ درصد سویه ها بود.

همچنین، ۴ الگوی پروفاژی نیز در میان سویه ها شناسایی گردید که الگوی شماره ۱ که متشکل از تمامی پروفاژ تایپهای شناسایی شده بود در ۹ درصد از سویه ها شناسایی گردید. از طرف دیگر، الگوی شماره ۳ (شامل پروفاژ تایپهای SGB، SGF، SGFa و SGFb) نیز به عنوان فراوانترین الگو معرفی گردید و ۶۹ درصد سویه ها واجد این الگوی پروفاژی بودند. تمامی سویه های واجد پروفاژ تایپهای SGA و SGL به عنوان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* اکتسابی از جامعه طبقه بندی شدند و حامل SCC*mec* تایپهای IVa و V بودند.

جدول ۲- فراوانی پروفاژ تایپها و الگوهای پروفاژی در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم.

الگوی پروفاژی	پروفاژ تایپ						تعداد (درصد)
	SGA	SGB	SGF	SGFa	SGFb	SGL	
۱	+	+	+	+	+	+	۵ (۹)
۲	+	−	+	+	+	+	۲ (۴)
۳	−	+	+	+	+	−	۳۸ (۶۹)
۴	−	−	+	+	+	−	۱۰ (۱۸)

بحث

عفونت ادراری از جمله مهمترین و آزاردهنده ترین عفونتها در انسان محسوب می شود که توسط طیف وسیعی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی ایجاد می شود که معمولا به دو فرم اسپورادیک و عود شونده مشاهده می گردد. عفونت ادراری در صورت تشخیص اشتباه عامل بیماریزا و عدم ارائه راهکار درمانی مناسب به یک عفونت عود شونده و تهدید کننده زندگی مبدل خواهد شد که امکان درمان آن با استفاده از تمهیدات درمانی معمول میسر نیست (۱۴). تشکیل بیوفیلم توسط سویه های باکتریایی مختلف از دلایل اصلی عود عفونت ادراری محسوب می شود. *استافیلوکوکوس اورئوس* به دلیل داشتن توانایی اتصال به سطوح زنده و غیرزنده و تشکیل بیوفیلم از جمله باکتریهای بسیار مهم ایجاد کننده عفونت ادراری عود شونده به شمار می رود (۳). بنابراین شناسایی صحیح این سویه ها از اهمیت بالایی در کنترل عفونت برخوردار می باشد. در این مطالعه ۸ درصد ایزوله های جمع آوری شده از بیمارستان متعلق به گونه *اورئوس* نبودند و در آزمایشگاه به اشتباه مورد شناسایی قرار گرفته بودند. با توجه به اینکه شناسایی باکتریها در آزمایشگاه های تشخیص طبی مبتنی بر آزمونهای فنوتایپی و بیوشیمایی می باشد که بر اساس ماهیت این قبیل آزمونها این اشتباهات چندان دور از تصور نیست و پیشتر نیز چنین اشتباهاتی از ایران گزارش شده است (۵, ۱۵). نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از آزمون PCR با پرایمرهای اختصاصی یک روش بسیار سریع، مقرون به صرفه و کارآمد جهت شناسایی ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* محسوب می شود که در مدت زمان کمتر از ۴ ساعت با حساسیت و اختصاصیت بالایی، در مقایسه با روشهای فنوتایپی، امکان شناسایی صحیح را فراهم می سازد.

بر اساس نتایج حاصل از آزمونهای غربالگری آگار با استفاده از محیط واجد آنتی بیوتیک، انتشار دیسک سفوکسی تین در محیط مولر هینتون آگار و تعیین ژن *mecA* در مجموع فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین ۲۸ درصد تعیین گردید. به طور کلی آمارهای متفاوتی از فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در نمونه های ادراری در ایران وجود دارد. رحیمی و همکاران در سال ۲۰۱۶ فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین را در میان بیماران واجد سوند ادراری ۲۵/۸ درصد اعلام کردند (۳). در مطالعه دیگری در سال ۱۳۹۹ فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در شهرهای تهران، کرج و اصفهان ۲۸ درصد گزارش گردید (۱۶). همچنین، در فاصله سالهای ۱۳۹۸-۱۳۹۵ فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در شهرهای تهران و اصفهان ۳۶ درصد اعلام گردید (۱۷). در گزارش کریمی و رحیمی نیز در سال ۱۳۹۶ فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در اصفهان ۳۳ درصد بود (۲). در مطالعه مصطفوی و رحیمی در سال ۱۳۹۶ نیز ۴۳ درصد سویه ها نسبت به سفوکسی تین مقاوم بودند (۱۸). در سال ۱۴۰۰ نیز فراوانی مقاومت به متی سیلین در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* در شهر اصفهان ۳۷ درصد گزارش شد (۱۵). همچنین در بازه زمانی ۲۰۱۵-۲۰۱۳ فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در بیماران مبتلا به پیلونفریت در ایران ۵/۸۳ درصد بود (۱۹). در سال ۲۰۲۲ فراوانی مقاومت به متی سیلین در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* در عفونتهای ادراری بیماران در عراق ۷/۷ درصد گزارش گردید (۱۴). در ایتالیا شیوع سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در بیماران واجد سوند ۴۳/۲ درصد بوده است (۲۰). به طور کلی این تفاوت در فراوانی مقاومت به متی سیلین در میان سویه های *استافیلو کوکوس اورئوس* می تواند ناشی از انتشار کلونال متفاوت کلونهای مختلف در نقاط مختلف جهان، تفاوت در سیاستهای کنترل عفونت و درمانی در کشورها، شهرها و بیمارستانهای مختلف باشد. همچنین وضعیت فرهنگی، اقتصادی و بهداشتی افراد ساکن در شهرهای مختلف و همچنین سرپایی یا بستری بودن بیماران نیز در این مورد بسیار حائز اهمیت است.

تشخیص نادرست سویه ها و ارائه راهکارهای درمانی اشتباه می تواند منجر به عود عفونت و ظهور سویه های مقاوم به چند دارو و گردش آنها در بیمارستانها و جامعه شود.

به منظور بررسی تشکیل اسلایم و بیوفیلم در میان سویه ها، در این مطالعه از روشهای کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت استفاده گردید که بر این اساس ۴۱ درصد سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین به روش قرمز کنگو به عنوان اسلایم مثبت گزارش شدند که از این میان ۷۸ درصد با آزمون میکروتیتر پلیت قطعا بیوفیلم مثبت بودند. تا کنون آمارهای متفاوتی (۶۷-۹۴ درصد) از فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد بیوفیلم در کشور گزارش شده است (۲, ۳, ۱۵, ۱۶, ۱۸, ۲۱-۲۵). در مطالعه حاضر ۵۵ سویه اسلایم مثبت و اسلایم مشکوک بودند که از این میان تنها ۴۳ سویه قادر به تشکیل بیوفیلم بودند. بنابراین با توجه به این یافته ها می تواند اذعان داشت که روش کمی میکروتیتر پلیت یک روش اختصاصی و حساس برای تعیین تشکیل بیوفیلم می باشد و روش کیفی ژلوز قرمز با توجه به حساسیت پایینتر بهتر است به عنوان روش غربالگری اولیه مورد استفاده قرار گیرد.

بر اساس نتایج حاصل از آزمون SCC*mec* تایپینگ مشخص گردید که ۸۷ درصد سویه ها اکتسابی از بیمارستان (واجد تایپ III) و ۱۳ درصد نیز اکتسابی از جامعه هستند. در میان سویه های اکتسابی از جامعه دو SCC*mec* تایپ IVa (۶ درصد) و V (۷ درصد) شناسایی شدند. این یافته ها منطبق بر سایر گزارشات در ایران (نمونه های بالینی، دامی، محیطی و غذایی) می باشد که در تمامی مطالعات SCC*mec* تایپ III به عنوان تایپ غالب در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* اکتسابی از بیمارستان معرفی شده است و سویه های اکتسابی از جامعه نیز واجد تایپهای IV و V بوده اند (۱, ۳, ۸, ۱۵, ۱۶, ۲۹-۲۶). به طور کلی از تمامی گزارشات اینگونه می توان استنباط کرد که با توجه به شیوع بالای سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین واجد SCC*mec* تایپ III در منابع مختلف در شهرهای کشور احتمالا این سویه ها متعلق به چند کلون تایپ شاخص هستند که از بیمارستان وارد محیط شده و در جامعه در حال انتشار هستند و مجددا از جامعه وارد محیط بیمارستان شده و چرخه انتشار خود را گسترش می دهند. با توجه به اینکه سویه های اکتسابی از بیمارستان تحت فشارهای انتخابی محیط بیمارستان مبدل به سویه هایی با قدرت بیماریزایی بالا و واجد مقاومتهای آنتی بیوتیکی چندگانه شده اند، لذا انتشار این سویه ها در منابع مختلف در ایران یک معضل بهداشتی بسیار حائز اهمیت می باشد.

در این پژوهش تمامی پروفاژ تایپها به استثناء پروفاژ تایپ SGD مورد شناسایی قرار گرفتند که در این میان تمامی سویه ها واجد پروفاژ تایپ SGF و ساب تایپهای SGFa و SGFb بودند. همچنین دو پروفاژ تایپ SGA و SGL نیز در ۱۳ درصد سویه ها حاضر بودند که همان سویه های اکتسابی از جامعه واجد SCC*mec* تایپهای IV و V بودند. این یافته ها پیشتر در سایر گزارشات ارائه شده از ایران نیز مشاهده شده است (۱, ۸, ۱۵, ۱۶, ۲۶-۳۲). علاوه بر این، ۴ الگوی پروفاژی نیز در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم شناسایی گردید که نشان دهنده تنوع نسبتا بالای سویه های مورد مطالعه است. سویه های واجد الگوی پروفاژی شماره ۱ به طور بالقوه قادر به تولید طیف وسیعی از عوامل حدت از قبیل پنتون-ولنتاین لکوسیدین، TSST-1، اکسفولیاتیو توکسین A، لیپاز، بتا-لیزین، استافیلوکیناز، انتروتوکسینها A، G، K، P و Q می باشند. همچنین، چنانچه پیشتر و در سایر مطالعات اعلام شده است بررسی حضور پروفاژ تایپ SGA به عنوان شاخص سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* اکتسابی از بیمارستان می تواند جایگزین شناسایی ژن *pvl* باشد (۱, ۸, ۲۸, ۳۱).

نتیجه گیری

گسترش و شیوع فزاینده سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم در سالهای اخیر در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری به یکی از چالشهای مهم کنترل عفونت در این بیماران مبدل شده است. این سویه ها که اغلب منشاء بیمارستانی داشته و واجد انواع مختلفی از

پروفاژ تایپها هستند، از مقاومت آنتی بیوتیکی بالایی برخوردار بوده که قادر به تولید طیف وسیعی از عوامل بیماریزایی و طبیعتا بیماریهای مختلف می باشند. عدم اتخاذ و اجرای سیاستهای کنترل عفونت در بیمارستانها و عدم فرهنگ سازی مناسب در جامعه باعث شده است که میزان شیوع سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین و مولد بیوفیلم هر ساله در کشور افزایش یابد که منجر به تحمیل هزینه های بالای درمانی به بیماران و سیستم بهداشتی کشور می شود. بنابراین شناسایی صحیح سویه ها، بررسی عوامل بیماریزایی و تشکیل بیوفیلم، تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و تعیین انتشار کلونال سویه ها با استفاده از روشهای مناسب و سریع جهت کنترل عفونت و ممانعت از گسترش عفونت در بیمارستانها، و انتخاب راهکار درمانی مناسب بسیار حائز اهمیت می باشد.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ تضاد منافعی در رابطه با نویسندگی و یا انتشار این مقاله ندارند.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان (گرنت اختصاصی اعضای هیأت علمی دانشگاه اصفهان) به انجام رسیده است.

REFERENCE

1. Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characteristics of hospital-and community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. Journal of Medical Microbiology. 2014;63(6):796-804.
2. Karimi A, Rahimi F. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infection in a hospital in Isfahan during 2016 Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2019;24(86):26-35.
3. Rahimi F, Katouli M, Karimi S. Biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from catheterized patients with urinary tract infection. Microbial Pathogenesis. 2016;98:69-76.
4. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nature Reviews Microbiology. 2015;13(5):269.
5. Rahimi F, Mehmandoost J, Danesh M. Misidentification of common pathogenic bacteria in a university hospital laboratory. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2016;21(72):49-54.
6. Rahimi F. Biofilm production among *Staphylococcus aureus* strains isolated from healthy people. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine 2015;20(68):9-21.
7. Rahimi F. Molecular characteristics of biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates causing urinary tract infections. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2018;13(6):e61704.
8. Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in sewage treatment plants in Tehran, Iran. Journal of Water and Health. 2021;19(2):216-28.
9. Anjum MF, Marco-Jimenez F, Duncan D, Marín C, Smith RP, Evans SJ. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from animals and animal products in the UK. Frontiers in Microbiology. 2019;10:2136.
10. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 31th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2021.
11. Ciesielczuk H, Xenophontos M, Lambourne J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring *mec*C still eludes us in East London, United Kingdom. Journal of Clinical Microbiology. 2019;57(6):e00020-19.

12. Zhang K, McClure J-A, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology. 2005;43(10):5026-33.

13. Pantůček R, Doškař J, Růžičková V, Kašpárek P, Oráčová E, Kvardová V, et al. Identification of bacteriophage types and their carriage in *Staphylococcus aureus*. Archives of Virology. 2004;149(9):1689-1703.

14. Khaleel RA, Alfuraiji N, Hussain BW, Nassar MF, Ebrahimzadeh F. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in urinary tract infections; prevalence and antimicrobial resistance. Journal of Renal Injury Prevention. 2021;11(1):e8.

15. Rahimi F. Frequency of methicillin resistant *S. aureus* strains isolated from patients with diabetic foot infection in Isfahan during 2021. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2022;27(99):1-12.

16. Rahimi F, Mohaghegh F, Mostafavi NS. Clonal dissemination of biofilm producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infection in Tehran, Karaj and Isfahan during 2018. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2020;25(89):16-25.

17. Rahimi F. Frequency of resistance to methicillin among *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infection in Tehran and Isfahan during 2016-2019. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2021;26(95):46-55.

18. Mostafavi NS, Rahimi F. Frequency of agr types and resistance to aminoglycosides among biofilm producing *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary infection in Isfahan during 2017. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2022;27(97):17-26.

19. Darvishi M. Antibiotic resistance pattern of uropathogenic methicillin-resistant staphylococcus aureus isolated from immunosuppressive patients with pyelonephritis. Journal of Pure and Applied Microbiology. 2016;10(4):2663-8.

20. Petrelli D, Repetto A, D'ercole S, Rombini S, Ripa S, Prenna M, et al. Analysis of meticillin-susceptible and meticillin-resistant biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from catheter infections isolated in a large Italian hospital. Journal of Medical Microbiology. 2008;57(3):364-72.

21. Rahimi F. Isolation of biofilm producing methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* strains from patients with urinary tract infection in Isfahan. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2018;23(82):37-44.

22. Ghasemian A, Najar Peerayeh S, Bakhshi B, Mirzaee M. The microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) genes among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from hospitalized children. Iranian Journal of Pathology. 2015;10(4):258-64.

23. Kadkhoda H, Ghalavand Z, Nikmanesh B, Kodori M, Houri H, Maleki DT, et al. Characterization of biofilm formation and virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolates from paediatric patients in Tehran, Iran. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2020;23(5):691.

24. Mostafavi NS, Mohaghegh F, Rahimi F. Phenotypic comparison of biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients in Tehran and Isfahan. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2020;25(91):15-21.

25. Yousefi M, Pourmand MR, Fallah F, Hashemi A, Mashhadi R, Nazari-Alam A. Characterization of *Staphylococcus aureus* biofilm formation in urinary tract infection. Iranian Journal of Public Health. 2016;45(4):485.

26. Rahimi F, Danesh M, Mehmandoost J, Shokri D. Prophage typing and SCC*mec* typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients in Isfahan. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2016;20(71):49-58.

27. Rahimi F, Karimi S. Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from poultry in Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2015;10(4):e30885.

28. Rahimi F, Shafiei R. Characteristics of enterotoxin-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from meat in Tehran, Iran. Journal of Consumer Protection and Food Safety. 2019;14(4):389-98.

29. Rahimi F, Qasemi A. Epidemiological link between methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from 2 different cities in Iran. Infectious Diseases in Clinical Practice. 2019;27(3):163-9.

30. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie M. Prophage typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013;6(1):80-5.

31. Rahimi F, Shokoohizadeh L. Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains among inpatients and outpatients in a referral hospital in Tehran, Iran. Microbial Pathogenesis. 2016;97:89-93.

32. 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.