بررسی فنوتیپی تولید بیوفیلم و مطالعه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جداشده از بیماران بستری در بیمارستان در مقایسه با سویه های جداشده از افراد سالم

حسن وطن خواه حسن آباد[۱]، محمد شفیعی[۲]، مهناز سیفی[۳]، محمدرضا پورشفیع[۴]، ملیحه طالبی[۵]، دلاورشهباززاده*[۶]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری شناسی، انستیتو پاستور ایران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری شناسی، انستیتو پاستور ایران
۳. PhD باکتری شناسی، استادیار انستیتو پاستور ایران
۴. PhD باکتری شناسی، دانشیار انستیتو پاستور ایران
۵. PhD باکتری شناسی استادیار دانشگاه علوم پزشکی ایران
۶. PhD بیوشیمی، استادیار انستیتو پاستور ایران

* **نشانی برای مکاتبه**: تهران، خیابان ۱۲ فروردین جنوبی، انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی، shahbazzadeh@yahoo.com
دریافت مقاله: مرداد هشتاد و نه پذیرش برای چاپ: شهریور هشتاد و نه

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس امروزه به عنوان یکی از مهمترین عوامل عفونت زای مرتبط با استفاده از وسایل خارجی درون بدن بیماران (کاتترهای درون رگی، شانت های درون سیستم عصبی،...) شناخته شده است. یکی از مهمترین فاکتورهای عفونت زا در این باکتری ها، توانایی تولید بیوفیلم و تشکیل مجموعه باکتریایی بر روی سطوح وسایل خارج سلولی می باشد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی فنوتیپی توانایی تولید بیوفیلم با دو روش کنگورد آگار(تست کیفی) وآزمون میکروتیترپلیت(تست کمی)، و مقایسه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان در مقایسه با سویه های جدا شده از افراد سالم می باشد.*

روش کار: *در این مطالعه ۵۵ سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از بیماران بستری در یکی از بیمارستان های شهر تهران و همچنین ۲۳ سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از بازوی افراد سالمی هیچ ارتباطی با مراکز درمانی نداشته اند و در طول ۳ ماه گذشته در بیمارستان بستری نشده بودند، با استفاده از آزمون های معمول آزمایشگاهی (رنگ آمیزی گرم ،تست کاتالاز، کواگولاز، DNase ، PYR، تست اوره و...) جداسازی و شناسایی شد. توانایی تولید بیوفیلم با استفاده از آزمون های فنوتیپی کنگورد‌آگار و میکروتیترپلیت مورد ارزیابی قرارگرفت. بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی این سویه ها با روش دیسک دیفیوژن برای دیسکهای اگزاسیلین،سفوکسیتین، کلرامفنیکل، اریترومایسین، تتراسیکلین، مینوسیکلین، پنی سیلین G، کانامایسین، آمیکاسین، لینزولید، فوزیدیک اسید، سیپروفلوکسازین، توبرامایسین، کوتریموکسازول، کلیندامایسین، سینرسید، ریفامپین، نیتروفورانتوئین، جنتامایسین انجام شد.*

یافته ها: *از مجموع ۵۵ سویه جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان با روش کنگورد آگار، ۴۵ سویه(٪۸۱) بیوفیلم مثبت، ۵سویه (٪۹/۵) نامشخص، و ۵سویه(٪۹/۵) بیوفیلم منفی بودند. از ۲۳ سویه جدا شده از افراد سالم ۳ سویه(٪۱۳) بیوفیلم مثبت،۶سویه (٪۲۶) نامشخص و ۱۴سویه(٪۶۱) بیوفیلم منفی مشاهده شد. در بررسی کمی تولید بیوفیلم با استفاده از آزمون میکروتیترپلیت در نمونه های بیمارستانی ۳۶ سویه(٪۶۵/۵) چسبنده قوی، ۱۴ سویه(٪۲۵/۵) چسبنده ضعیف، و ۵سویه(٪۹) فاقد توانایی چسبندگی شناسایی شد. درسویه های جدا شده از افراد سالم ۵سویه(٪۲۱/۵) چسبنده قوی، ۵سویه (٪۲۱/۵) چسبنده ضعیف، و۱۳سویه(٪۵۷) فاقد توانایی چسبندگی بودند. میزان مقاومت به اگزاسیلین، پنی سیلین ، اریترومایسین، کلیندامایسین، سیپروفلوکسازین و کوتری موکسازول در سویه های بیمارستانی به ترتیب ۸۲ ٪، ۹۱٪، ۷۴/۵ ٪، ۵۱٪، ۴۹٪، ۶۵/۵ ٪بود. این الگوی مقاومت در سویه های افراد سالم به صورت۲۲٪، ۵۶/۵ ٪، ۱۳٪، ۴/۳ ٪،۴/۳ ٪ و ۲۶ ٪ بود.*

نتیجه گیری: *تولید بیوفیلم در سویه های جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان با هردو روش کمی و کیفی بیشتر از سویه های جداشده از افراد سالم بود. نتایج تست کمی و کیفی تولید بیوفیلم در ٪۸۰-۷۰ از موارد همخوانی داشتند. مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های بیمارستانی بالاتر از سویه های افراد سالم بود. در عفونت های بیمارستانی، از این دو ویژگی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (تولید بیوفیلم بیشتر و مقاومت آنتی بیوتیکی بالاتر) می توان در تشخیص و تمایز سویه های تهاجمی و بیماریزا از سویه های فلورنرمال ساپروفیت استفاده کرد.*

واژگان کلیدی: ***فنوتیپ، بیوفیلم، مقاومت، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس***

مقدمه

استافیلوکوکوس های کوآگولاز منفی ساکنین طبیعی پوست و سطوح مخاطی بدن انسان می باشند که در این میان استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس شایع ترین سویه شناخته شده در میان این جمعیت باکتریایی می باشد (۱). در سالهای اخیر استافیلوکوک های کوآگولاز منفی ، بویژه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به عنوان یکی از مهمترین عوامل عفونت های بیمارستانی مرتبط با استفاده از وسایل خارجی درون بدن بیماران (کاتترهای درون رگی، شانت های درون سیستم عصبی، دریچه های مصنوعی قلب و مفاصل مصنوعی)، در نظر گرفته می شوند(۲و۳). اساسی ترین مرحله در بیماری زایی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در رابطه با وسایل خارجی درون بدن بیماران، توانایی این ارگانیسم در اتصال و تولید بیوفیلم بر روی این سطوح می باشد(۴).

بیوفیلم تجمعی از باکتری ها می باشد که توسط ماتریکسی متشکل از پروتئین ها و پلی ساکارید های خارج سلولی احاطه شده است که باعث چسبندگی و اتصال باکتری ها به یکدیگر و سطوح وسایل خارجی درون بدن بیماران می شود. وجود این ساختار چند لایه، باکتری را از دسترس سیستم ایمنی میزبان دور نگه می دارد. هم چنین مطالعات نشان داده است که تشکیل بیوفیلم به طور مشخصی فعالیت و اثر ونکومایسین و دیگرآنتی بیوتیک ها را علیه استافیلوکوک ها کاهش می دهد(۵). فرآیند چسبیدن و تولید بیوفیلم در این باکتری شامل دو مرحله: ۱. اتصال اولیه (initial adherence) باکتری به سطوح پلیمری با کمک پروتئین اتولیزین (محصول ژن *atlE*) ۲. تجمع و تراکم (accumulation) چند لایه ی باکتری ها و تولید پلی ساکارید های خارج سلولی می باشد (۶). مهم ترین فاکتور دخیل در تجمع و تولید بیوفیلم در این سویه ها، پلی ساکارید اتصال دهنده بین سلولی **PIA**(polysaccharide intercellular adhesin) است که محصول اپرون ***ica*** می باشد. این اپرون دارای ۴ژن ساختاری(*icaA,D,B,C*) می باشد که در ساختن، پلیمریزه کردن و ترشح این پلی ساکارید به خارج از سطح باکتری ایفای نقش می کنند (۲) . همچنین بررسی های انجام شده نشان داده است که پروتئین AAP (accumulated associated protein) در رشد و تجمع باکتری ها بر روی سطوح پلیمری نقش بارزی ایفا می کند (۵).

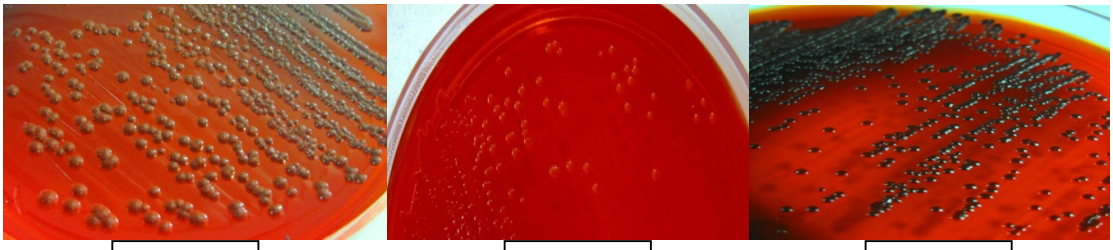
به منظور بررسی فنوتیپی تولید بیوفیلم در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از روش های مختلف استفاده می شود که مهمترین روش کیفی تولید بیوفیلم، کشت بر روی محیط کنگورد آگار(CRA agar) است(۷). سویه های تولید کننده بیوفیلم بر روی محیط کنگورد آگار، کلنی های سیاه رنگ ایجاد می کنند و سویه هایی که این توانایی را ندارند، دارای کلنی های قرمز هستند. باکتری های دارای کلنی های قرمز تیره از نظر توانایی تولید بیوفیلم نامشخص می باشند. از روش میکروتیتر پلیت به عنوان مهم ترین روش کمی بررسی تولید بیوفیلم استفاده می شود. در روش میکروتیترپلیت، سویه هایی که خاصیت چسبندگی بیشتر و محکم تری به ته چاهک ها دارند، بیوفیلم بیشتری تولید می کنند (۸). نتایج حاصل از بررسی های صورت گرفته نشانگر این مطلب است که سویه های جداشده از بیماران مختلف بستری در بیمارستان نسبت به سویه های جدا شده از افراد سالم ، خاصیت تهاجمی و توانایی بیشتری در تولید بیوفیلم دارند و هم چنین دارای مقاومت آنتی بیوتیکی بالاتری می باشند(۱و۵و۹و۶).

هدف از انجام این مطالعه، مقایسه فنوتیپی توانایی تولید بیوفیلم در سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان با سویه های جدا شده از افراد سالم می باشد. هم چنین مقایسه مقاومت آنتی بیوتیکی درسویه های دو گروه بیماران و افراد سالم مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار

از مجموع ۱۲۰ سویه استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی جدا شده ازبیماران دارای نقص ایمنی و یا بیماران مبتلا به بدخیمی بستری در بخش مراقبت های ویژه(ICU) و بخش پیوند مغز استخوان تعداد ۵۵ سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس با استفاده از تست های معمول آزمایشگاهی (رنگ آمیزی گرم ،تست کاتالاز، کواگولاز، DNase ، PYR، تست اوره، حساسیت به باسیتراسین و نوبیوسین وتست تخمیر قندها) جداسازی شد. به منظور اطمینان از عدم آلودگی، به هنگام نمونه گیری، سویه هایی وارد مطالعه ما شدند که طی دو بار نمونه گیری در زمان های متفاوت، گونه یکسانی جداسازی و شناسایی شد. از تعداد ۵۵ نمونه، ۲۷ نمونه (۴۹،۱٪) از کشت خون،۱۹ نمونه (۳۴،۵٪) از کاتترهای درون رگی، ۹ نمونه (۱۶،۴٪) از زخم بیماران جداسازی و شناسایی شد. همچنین ۲۳ نمونه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از بازوی افراد سالمی که هیچ ارتباطی با مراکز درمانی نداشته اند و در طول ۳ ماه گذشته در بیمارستان بستری نشده بودند جداسازی و شناسایی شد.

برای بررسی کیفی تولید بیوفیلم با استفاده ازتست کنگورد آگار پلیت) (CRA plateسویه های جداشده بر روی محیط BHI آگار حاوی g/l ۰/۸ کنگورد و g/l ۳۶ ساکارز کشت داده شدند. سویه ها پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه به مدت ۱۸ ساعت (overnight) در دمای اتاق باقی ماندند. سویه هایی که کلنی های آنها بر روی محیط سیاه رنگ بوده، مثبت و سویه هایی که کلنی های آنها قرمز رنگ بوده منفی در نظر گرفته شدند(۷، تصویر ۱).

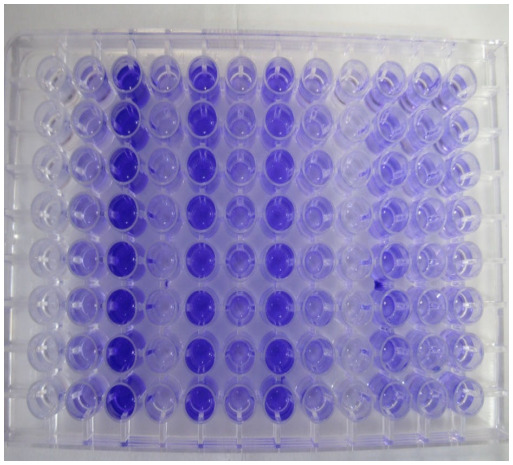


شکل ۱-۱ | شکل۲-۱ | شکل ۳-۱

تصویر۱:رنگ کلنی ها برروی محیط کشت کنگوردآگار: شکل **۱-۱** : نامشخص،کلنی های قرمز تیره ، شکل **۲-۱**: منفی، کلنی های قرمز روشن، شکل **۳-۱**: مثبت، کلنی های سیاه

برای بررسی کمی تولید بیوفیلم با استفاده از تست میکروتیتر پلیت MTP (assay) سویه ها در ml ۵ محیط TSB حاوی۰/۲۵٪ گلوکز به مدت ۲۴ ساعت درون شیکر انکوباتور، انکوبه شدند. سپس این سوسپانسیون به نسبت ۱به ۱۰۰ با محیط TSB حاوی۰/۲۵٪ گلوکز رقیق شد. از این محلول ۲۰۰ میکرولیتر به هر کدام از چاهک های میکرو پلیت تلقیح شد (از هر سویه درون ۳ چاهک تلقیح شد triplicate). میکروپلیت به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه نگه داری شد. پس از ۴ بار شستشو با محلول PBS ، نمونه ها با کریستال ویوله ۰/۱٪ رنگ امیزی شده و ۳ بار با آب مقطر شستشو داده شد. پس از خشک شدن میکروپلیت، ۲۰۰ میکرولیتر الکل استون درون هر چاهک ریخته شده و پس از ۳دقیقه الکل استون درون چاهک ها همراه با چند بار sampling به میکروپلیت دیگری ریخته شده و OD این میکروپلیت در طول موج ۵۷۰ nm خوانده شد. جهت محاسبه cut-off از فرمول زیر استفاده شد :

Cut-off = (mean + 3SD)+ OD Blank که mean میانه و SD انحراف معیار ۱۰-۸ تا از سویه هایی است که از نظر تولید بیوفیلم منفی هستند. Blank هم میانگین OD چاهک هایی می باشد که فقط دارای محیط کشت گلوکزدار می باشند (بدون تلقیح باکتری به چاهک ها). بر اساس cut-off محاسبه شده نمونه هایی که OD آنها زیر ۰/۳۵ باشد منفی (non-adherent) ، نمونه هایی که OD انها بین ۰/۳۵ تا ۰/۴۹ باشد چسبنده ضعیف(weakly adherent)، و نمونه هایی که OD آنها بالاتراز ۰/۵ باشد چسبنده قوی (strongly adherent) در نظر گرفته می شوند(۸،تصویر۲).



تصویر۲: ستون شماره ۶، ۴، ۳،۱ به ترتیب : ستون ۱: بلانک ، ستون ۳: چسبنده قوی، ستون ۴: فاقد قدرت چسبندگی، ستون ۶: چسبنده ضعیف

مقاومت آنتی بیوتیکی کلیه سویه های جداشده نسبت به ۱۹ آنتی بیوتیک توصیه شده در لیست **CLSI** با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت. دیسک های مورد استفاده از شرکت MAST تهیه شدند و شامل:اگزاسیلین،سفوکسیتین، کلرامفنیکل، اریترومایسین، تتراسیکلین، مینوسیکلین، پنی سیلین G، کانامایسین، آمیکاسین، لینزولید، فوزیدیک اسید، سیپروفلوکسازین، توبرامایسین، کوتریموکسازول، کلیندامایسین، سینرسید، ریفامپین، نیتروفورانتوئین و جنتامایسین بودند.

یافته ها

در آزمون کیفی تولید بیوفیلم از مجموع ۵۵ سویه بیمارستانی، ۴۵ سویه(۸۱٪) کلنی های سیاه رنگ (بیوفیلم مثبت) برروی محیط کنگوردآگار ایجاد کردند، ۵سویه (۹/۵٪) کلنی های قرمز (بیوفیلم منفی) ایجاد کردند، و در ۵سویه (۹/۵٪) باقی مانده کلنی های قرمز تیره(نامشخص از نظر تولید بیوفیلم) ایجاد شد. در حالی که از ۲۳ سویه جداشده از افراد سالم، ۳سویه(۱۳٪) از سویه های افراد سالم بیوفیلم مثبت، ۱۴ سویه(۶۱٪) بیوفیلم منفی و ۶ سویه(۲۶٪) بیوفیلم نامشخص ایجاد کردند.

آزمون کمی تولید بیوفیلم نشان داد که در نمونه های بیمارستانی ۳۶ سویه(۶۵/۵٪) چسبنده قوی، ۱۴ سویه(۲۵/۵٪) چسبنده ضعیف، و ۵ سویه(۹٪) فاقد قدرت چسبندگی بودند. در نمونه های افراد سالم ۵سویه (۲۱/۷٪) چسبنده قوی، ۵ سویه (۲۱/۷٪) چسبنده ضعیف و ۱۳سویه (۵۶/۶٪) فاقد قدرت چسبندگی بودند.

مقایسه نتایج آزمون های فنوتیپی کمی و کیفی تولید بیوفیلم در هردو گروه سویه های افراد سالم و بیمارستانی در جدول ۱و۲ آورده شده است. همانگونه که این جداول نشان می دهند بین آزمون کمی و کیفی مطابقت نسبی وجود دارد. به عنوان مثال در نمونه های بیمارستانی، از مجموع ۴۵ سویه دارای کلنی های سیاه رنگ در آزمون کنگوردآگار، ۳۴ سویه(۷۵/۶٪) چسبنده قوی ، ۱۰ سویه (۲۲/۲٪) چسبنده ضعیف و یک سویه(۲/۲٪) فاقد قدرت چسبندگی بود. و یا در نمونه های جدا شده از افراد سالم از مجموع ۱۴سویه قرمز رنگ، ۱۱ سویه (۷۸/۶٪) فاقد قدرت چسبندگی و ۳ سویه (۲۱/۴٪) چسبنده ضعیف بودند. هیچ کدام از سویه های دارای کلنی های قرمز رنگ در افراد سالم در آزمون کمی قدرت چسبندگی قوی نداشتند. در مورد تولید بیوفیلم در سویه های دارای کلنی های قرمز تیره در آزمون کنگوردآگار نمی توان قضاوت منطقی کرد. همانگونه که از جداول بر می آید به هنگام بررسی سویه های دارای کلنی های قرمز تیره در آزمون کمی میکروتیتر، این سویه ها در گروه های چسبنده قوی، چسبنده ضعیف و فاقد قدرت چسبندگی به صورت پراکنده پخش می شوند.

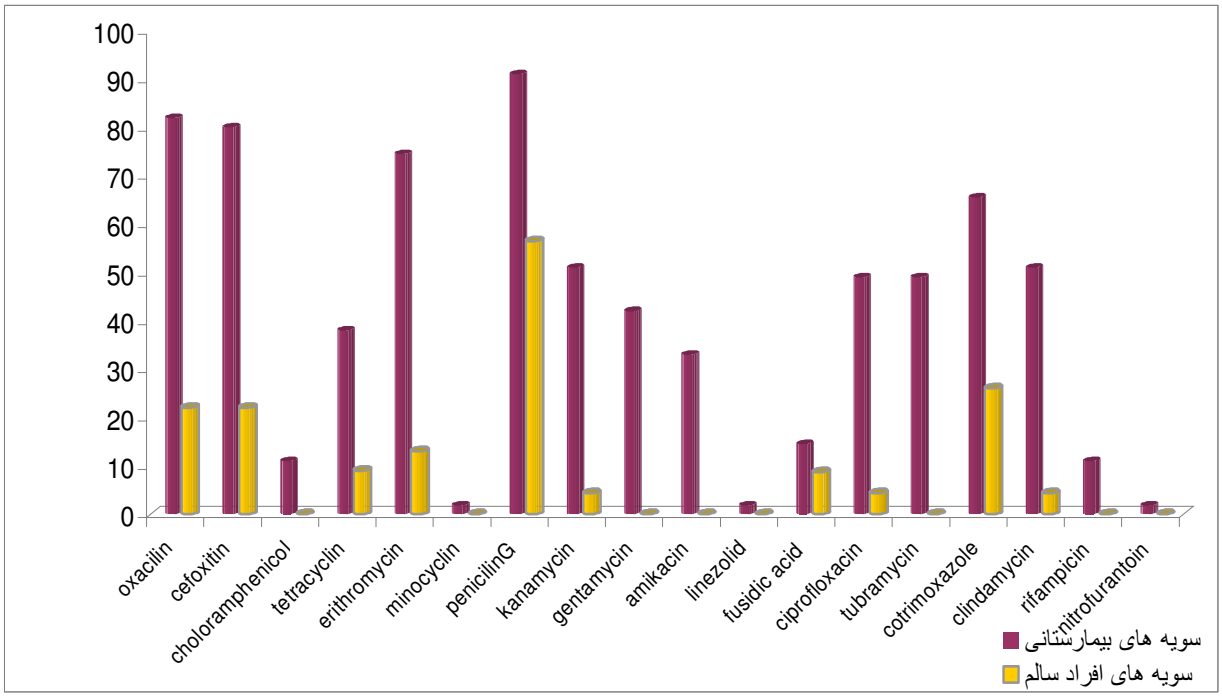
جدول ۱: مقایسه نتایج تست کمی وکیفی تولید بیوفیلم در نمونه های بیمارستانی

تست کمی / تست کیفی	سویه های چسبنده قوی	سویه های چسبنده ضعیف	سویه های فاقد قدرت چسبندگی	جمع کل
کلنی های سیاه رنگ	۳۴	۱۰	۱	۴۵
کلنی های قرمز تیره	۲	۰	۳	۵
کلنی های قرمز رنگ	۰	۴	۱	۵
جمع کل	۳۶	۱۴	۵	۵۵

جدول ۲: مقایسه نتایج تست کمی و کیفی تولید بیوفیلم در نمونه های افراد سالم

تست کمی / تست کیفی	سویه های چسبنده قوی	سویه های چسبنده ضعیف	سویه های فاقد قدرت چسبندگی	جمع کل
کلنی های سیاه رنگ	۲	۱	۰	۳
کلنی های قرمز تیره	۳	۱	۲	۶
کلنی های قرمز رنگ	۰	۳	۱۱	۱۴
جمع کل	۵	۵	۱۳	۲۳

مقاومت به سینرسید در هیچ کدام از نمونه های بیمارستانی و افراد سالم، مشاهده نشد. همه نمونه های جدا شده از افراد سالم نسبت به آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل، مینوسیکلین،آمیکاسین، لینزولید، توبرامایسین، ریفامپین، نیتروفورانتوئین و جنتامایسین حساسیت نشان دادند(نمودار۱).



نمودار۱: توزیع سویه های کلینیکی(۵۵ نمونه) و جداشده از افراد سالم (۲۳نمونه) استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بر اساس مقاومت آنتی بیوتیکی

بحث

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ساکن طبیعی پوست و سطوح مخاطی بدن انسان می باشد. در گذشته معمولا جداسازی این میکروارگانیسم از کشت نمونه های کلینیکی به عنوان آلودگی در نظر گرفته می شد، اما در دو سه دهه اخیر به دنبال استفاده از روشهای تهاجمی و وسایل خارجی درون بدن بیماران، این سویه و سویه های استافیلوکوکوس کواگولاز منفی دیگر، به عنوان عوامل بیماری زای بیمارستانی شناخته شده اند. تشخیص و تمایز دادن سویه های بیماری زا و مهاجم از سویه های آلوده کننده و غیربیماری زا مشکلی است که هنوز به طور کامل حل نشده است. مقاومت آنتی بیوتیکی فزاینده نسبت به انواع آنتی بیوتیک ها در این باکتری ها در محیط بیمارستانها، نگرانی های زیادی را در رابطه با کنترل و انتقال این مقاومت به دیگر سویه های بیمارستانی به وجود آورده است. تقریبا در بیشتر موارد ، رابطه بین استفاده از وسایل پزشکی خارجی درون بدن بیماران بستری و عفونت زایی این سویه ها مشاهده شده است. مطالعات مختلف نشان داده است که اساسی ترین مرحله در عفونت زایی این سویه ها، توانایی میکروارگانیسم در چسبیدن و تولید بیوفیلم بر روی سطوح وسایل خارجی می باشد (۱ و۱۰). توانایی تولید بیوفیلم با استفاده از تست های فنوتیپی مختلفی مورد بررسی قرار می گیرد که تست کیفی کنگوردآگار و تست کمی میکروتیترپلیت از مهمترین روش ها می باشد(۷)

در این مطالعه، نتایج حاصل از بررسی کیفی تولید بیوفیلم نشان داد که ٪۸۱ درصد از نمونه های بیمارستانی بیوفیلم مثبت بودند، در حالی که ٪۱۳ از سویه های جدا شده از افراد سالم توانایی تولید بیوفیلم داشتند. در مطالعات انجام شده در سال ۱۹۹۶ در آمریکا نیز تفاوت چشمگیری در تولید بیوفیلم و مورفولوژی کلونی برروی محیط کنگوردآگار در سویه های کلینیکی در مقایسه با سویه های جداشده از افراد سالم مشاهده شد. سویه های کلینیکی بیشتر از سویه های افراد سالم توانایی تولید کلنی های سیاه رنگ دارند(۱۰). همچنین مطالعه محققین ایتالیایی در سال ۲۰۰۱ نشان داد که ٪۴۸/۵ از سویه های کلینیکی قادر به تولید بیوفیلم بودند، در حالی که هیچ کدام از سویه هایی که از افراد داوطلب سالم جداسازی شد بیوفیلم تولید نمی کردند (۱۱). نتایج این تحقیقات با نتایج بدست آمده در مطالعه ما همخوانی دارد.

نتایج بررسی کمی تولید بیوفیلم در این مطالعه نشان داد که ٪۶۵/۵ از سویه های بیمارستانی دارای قدرت چسبندگی قوی به سطوح پلی استیرن میکروپلیت بودند، و ٪۲۵/۵ سویه ها دارای قدرت چسبندگی ضعیف و ٪۹ سویه ها فاقد قدرت چسبندگی بودند. این آمار در سویه های افراد سالم به ترتیب زیر بود: ٪۲۱/۷ چسبنده قوی، ٪۲۱/۷ چسبنده ضعیف و ٪۵۶/۵ فاقد قدرت چسبندگی. دربررسی صورت گرفته در آمریکا، نشان داده شده است که سویه هایی که از بیماران بستری مبتلا به سپتی سمی ناشی از استفاده از کاتتر، جداسازی شده اند چسبندگی بیشتری نسبت به سویه های آلوده کننده کشت خون و سویه های جدا شده از پوست افراد سالم دارند (۸). بررسی های صورت گرفته در آمریکا نشان داد که در تست کمی تولید بیوفیلم، **٪۸۷** سویه های جدا شده از کشت خون توانایی چسبندگی به سطوح پلی استیرن داشتند که این میزان در نمونه های جداشده از افراد سالم **٪۱۱** بوده است(۱۰).

در بررسی های صورت گرفته توسط ziebuhr و همکاران که در آلمان در سال ۲۰۰۳ برروی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس انجام گرفت مشخص شد که ۸۷٪ سویه های جداشده از کشت خون، ۴۷٪ سویه های عفونت های مجاری ادراری و ۷٪ از سویه های فلور نرمال افراد سالم توانایی تولید بیوفیلم داشتند(۱۲). نتایج مطالعه ما و اکثر مطالعات صورت گرفته نشان داد که معمولا سویه های جدا شده از نمونه های بیمارستانی در مقایسه با سویه های ساپروفیت و جدا شده از افراد سالم، توانایی چسبندگی بیشتری به سطوح پلی استیرن و پلاستیکی داشتند. درحالی که در مطالعه سال ۲۰۰۸ در ایرلند، سویه های ایجاد کننده مننژیت مرتبط با استفاده از وسایل پزشکی، ۷۱,۴ ٪ سویه ها بیوفیلم تولید می کردند، اما تولید بیوفیلم در سویه های آلوده کننده ۸۴,۶٪ می باشد (۱۳). این تناقض را می توان اینگونه توجیه کرد که فاکتورهای دیگری علاوه بر تولید بیوفیلم در عفونت زایی و توانایی بیماری زایی این میکروارگانیسم ها دخیل اند.

درمورد هم خوانی بین دو روش کیفی و کمی بررسی تولید بیوفیلم در مطالعه ما مشخص شد که این دو روش در حدود۷۵٪ از موارد با هم مطابقت دارند. به عبارت دیگراکثر سویه های دارای کلنی های سیاه رنگ برروی محیط کنگو ردآگار، دارای قدرت چسبندگی قوی در آزمون میکرو تیتر پلیت بودند(۳/۹۹- ۰/۵=OD) و همچنین بیشتر سویه های دارای کلنی های قرمز رنگ، در آزمون کمی چسبنده ضعیف (OD کمتر از ۰/۳۵) بودند. شاید بتوان اینگونه نتیجه گیری کرد که تست کیفی از حساسیت بالاتر و تست کمی تولید بیوفیلم از اختصاصیت بالاتری برخوردار است.

به دلیل مشکلاتی که استافیلوکوک های کواگولاز منفی مقاوم به متی سیلین در بیمارستانها ایجاد می کنند، بررسی شیوع این سویه ها از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در این مطالعه ۸۲٪ از سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جداشده از نمونه های بیمارستانی و ۲۲٪ از سویه های افراد سالم نسبت به اگزاسیلین مقاوم بودند. در مطالعه انجام شده در آمریکا، ۷۷ ٪ از نمونه های کلینیکی و ۸٪ از نمونه های افراد سالم به اگزاسیلین مقاومت داشتند. (۱۰). همچنین ziebuhr و همکاران در سال ۲۰۰۴ در آلمان، مقاومت به اگزاسیلین در سویه های جدا شده ازکشت خون و سویه های فلورنرمال را به ترتیب ۸۳٪ و ۳٪ گزارش کردند (۱۲).

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی نشان داد که مقاومت به پنی سیلین ، اریترومایسین، کلیندامایسین، سیپروفلوکسازین و کوتری موکسازول در سویه های بیمارستانی به ترتیب ۹۱٪، ۷۴/۵٪ ، ۵۱٪، ۴۹٪، ۶۵/۵٪ بود. در حالی که مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیکها در سویه های افراد سالم به ترتیب ۵۶/۵٪، ۱۳٪، ۴/۳٪، ۴/۳٪، ۲۶٪ بود. که بیانگر میزان مقاومت بالاتر سویه های بیمارستانی نسبت به سویه های افراد سالم می باشد.که این مسئله می تواند به دلیل مصرف زیاد آنتی بیوتیک ها در بیمارستان ها و بالا بودن فشار انتخابی بر روی سویه های بیمارستانی می باشد.

نتیجه گیری

از آنجا که استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ساکن طبیعی پوست و سطوح مخاطی بدن انسان می باشد و با در نظرگرفتن این نکته که عفونت های بیمارستانی ناشی از این میکروارگانیسم ها در حال افزایش است، توانایی تمایز سویه های عفونت زا و تهاجمی از سویه های آلوده کننده فلورنرمال می تواند کمک شایانی در کنترل بیماریزایی این باکتری ها باشد. در مطالعه ما مشخص شد که سویه هایی که از بیماران بستری در بیمارستان به عنوان عامل عفونت جداسازی شد، نسبت به سویه هایی که از پوست افراد داوطلب سالم جداسازی شد دارای مقاومت آنتی بیوتیکی بالاتر و قدرت تولید بیوفیلم بیشتر بودند. البته تولید بیوفیلم و فرایند عفونت زایی نیاز به بررسی های بیشتر و دقیق تر مولکولی دارد که هم اکنون این مطالعات فنوتیپی و ژنوتیپی در انستیتوپاستور ایران توسط همین گروه در حال انجام می باشد.

REFERENCES

1. Piette A, Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. Veterinary Microbiology 2009;134:45–54.

2. Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, Loßner I, Gotz F, Hackerl J. A novel mechanism of phase variation of virulence in Staphylococcus epidermidis: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. Molecular Microbiology 1999;32(2): 345-356.

3. Mack D, Nedelmann M, Kroktsch A, Schwarzkopf A, Heesemann J, Laufs R. Characterization of Transposon Mutants of Biofilm-Producing Staphylococcus epidermidis Impaired in the Accumulative Phase of Biofilm Production: Genetic Identification of a Hexosamine-Containing Polysaccharide Intercellular Adhesin. Infection and Immunity 1994;58:3244-3253.

4. Nuryastuti T, Van der mei HC, Busscher HJ, Kuijer R, Aman AT, Krom BP. recA mediated spontaneous deletions of the icaADBC operon of clinical staphylococcus epidermidis isolates: a new mechanism of phenotypic variation. Antonie van leeuwenhoek 2008;94:317-328.

5. Otto M. Staphylococcus epidermidis- the accidental pathogen. Nature reviews,microbiology 2009;5(11):565-578.

6. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. The genetics of staphylococcal biofilm formation—will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection?. Clinical Microbiology and Infection 2005;123:967–973.

7. Silva GDI, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR, Day NPJ, Peacock SJ. The ica Operon and Biofilm Production in Coagulase-Negative Staphylococci Associated with Carriage and Disease in a Neonatal Intensive Care Unit. Journal of Clinical Microbiology 2002;56:382–388.

8. Christensen GD, Simpon WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Meleton DM, Edwin H, Beachey EH. 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;48:996-1006.

9. Gotz F. Staphylococcus and biofilms. Molecular Microbiology 2002;43(6):1367–1378.
10. Ziebuhr W, Heilman C, Meyer P, Hacker j. Detection of the intercellular adhesion gene cluster(ica) and phase variation in Staphylococcus epidermidis blood culture and mucosal isolates. Infection and Immunity 1997;63:890-896.

11. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. presence of icaA and icaD genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. Journal of clinical Microbiology 2001; 39(6):2151-2156.

12. Ziebuhr W, Kozitsaka S, Naber K. The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial staphylococcus epidermidis isolates: association with biofilm formation and resitance to aminoglycosides. Infection and Immunity 2004;72(2):1210-1215.

13. Stevens NT, Tharmabala M, DillaneT, O'Gara JP, Humphreys H. Biofilm and the role of the ica operon and aap in Staphylococcus epidermidis isolates causing neurosurgical meningitis. Clinical Microbiology and Infection 2008;14(7):716-730.