تولید بیوفیلم در میان سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از افراد سالم

فاتح رحیمی[1]*

۱-باکتری شناس، استادیار باکتری شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

***نشانی برای مکاتبه:** اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی، f.rahimi@sci.ui.ac.ir

دریافت مقاله: تیر نود و سه پذیرش برای چاپ: شهریور نود و سه

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس از جمله باکتری¬های بیماری زا در انسان به شمار می¬رود که قابلیت ایجاد طیف وسیعی از بیماری¬ها دارد. همانند استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس استافیلوکوکوس اورئوس نیز به عنوان عامل مهمی در ایجاد بیوفیلم در بیماران حائز اهمیت است. این مطالعه با هدف تعیین توانایی تولید بیوفیلم و الگوی مقاومتی سویه¬های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از افراد سالم در طی سال¬های ۱۳۹۲-۱۳۹۳ به انجام رسیده است.*

روش کار: *در این مطالعه ۲۰۰ فرد سالم انتخاب گردیدند. با استفاده از سوآپ استریل نمونه گیری از ناحیه بازو، ساعد و زیربغل این افراد انجام گرفت و سوآپ¬ها به محیط تایوگلیکولات براث انتقال داده شدند. سپس نمونه¬ها بر روی محیط مانیتول سالت آگار کشت شده و شناسایی سویه¬ها تا حد گونه با استفاده از آزمون¬های بیوشیمیایی و آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت. جهت تعیین تولید بیوفیلم از روش کیفی کنگورد آگار و کمی میکروتیتر پلیت استفاده گردید و حضور ژن¬های icaA و icaD با استفاده از PCR مشخص گردید. الگوی مقاومت آنتی¬بیوتیکی سویه¬ها به روش دیسک دیفیوژن نسبت به ۱۶ آنتی¬بیوتیک انجام گرفت، همچنین حداقل غلظت مهار کننده آنها نسبت به آنتی¬بیوتیکهای اگزاسیلین و ونکومایسین به روش broth micro-dilution با استفاده از توصیه های Clinical Laboratory and Standard Institute (CLSI) تعیین گردید. پروفاژ تایپ¬های مختلف با استفاده از آزمون Multiplex-PCR شناسایی شدند.*

یافته ها: *در مجموع ۷۹ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از افراد سالم جدا گردید که ۵۳ سویه به عنوان سویه¬های مولد بیوفیلم و ۲۶ سویه نیز به عنوان بیوفیلم منفی شناسایی شدند. در تمای ۵۳ سویه مورد نظر هر دو ژن icaA و icaD شناسایی شدند. تمامی ۷۹ سویه نسبت به پنی¬سیلین مقاوم بودند و بیشترین مقاومت نسبت به آنتی¬بیوتیک¬های اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، کانامایسین، توبرامایسین، تتراسایکلین و کلیندامایسین مشاهده شد. هیچ کدام از سویه¬ها نسبت به ونکومایسین، لینزولاید و سینرسید مقاومتی نشان ندادند. در مجموع ۵ پروفاژ تایپ و ۳ الگوی پروفاژی در میان سویه-ها شناسایی گردید.*

نتیجه گیری: *شیوع سویه¬های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی-سیلین مولد بیوفیلم و واجد مقاومت نسبت به طیف وسیعی از آنتی-بیوتیک¬ها در میان افراد سالم نشان¬دهنده کلونیزه شدن این افراد با سویه¬های بیمارستانی است. شیوع چنین سویه¬هایی که با توجه به الگوی پروفاژی می¬توانند رمزکننده طیف وسیعی از عوامل حدت در این سویه¬ها باشند یک خطر جدی برای سلامت جامعه به شمار می¬رود.*

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، بیوفیلم، افراد سالم، پروفاژ تایپ

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس از جمله باکتری‌های بیماری زا در انسان به شمار می‌رود که قابلیت ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها مانند ذات الریه، زرد زخم، سندرم شوک سمی استافیلوکوکی، عفونت‌های گوارشی و عفونت ادراری، را دارد(۱, ۲). این باکتری در طبیعت انتشار وسیع داشته و غالباً به عنوان میکروفلور طبیعی پوست و غشاهای مخاطی در بینی و بخش فوقانی دستگاه تنفس در انسان و حیوانات حضور دارد. باکتری‌ها می‌توانند به صورت بیوفیلم درسطح کاتترها و سوندهای ادراری رشد کنند و مقاومت فوق العاده‌ای نسبت به عوامل ضد میکروبی از خود نشان دهند(۳). *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* به عنوان مهم ترین گونه *استافیلوکوکوس* در تولید بیوفیلم به خصوص در دستگاه ادراری شناخته می‌شد، اما در حال حاضر *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اغلب به

عنوان مهم ترین عوامل ایجاد بیوفیلم در بیماران با عفونت ادراری حائز اهمیت هستند(۱, ۳, ۴).

بیوفیلم‌های باکتریایی در بیمارانی که از ابزارهای خارجی استفاده می‌کنند یک فرآیند دو مرحله‌ای است که مشتمل بر اتصال به سطوح، رشد، تکثیر و گسترش باکتری‌ها به شکل چندلایه است(۴). تشکیل بیوفیلم منجر به ایجاد عفونت‌های عود شونده می‌گردد که نسبت به درمان‌های ضدمیکروبی مقاومت نشان داده و باعث افزایش هزینه‌های ناشی از درمان می‌گردد(۵). تولید بیوفیلم ناشی از فعالیت اپرون *icaADBC* است که مسئول سنتز بخش عمده‌ای از ماتریکس اگزوپلی‌ساکاریدی، عامل چسبندگی بین سلولی پلی‌ساکاریدی (PI) و عامل گردهم آمدن سلول‌های باکتریایی در بیوفیلم است(۶). علاوه بر این، تولید PLS و ATL که به ترتیب رمز کننده پروتئین سطحی و اتولایزین هستند؛ نیز در تشکیل بیوفیلم اهمیت دارند(۷).

در اوایل ۱۹۴۰ پیش از معرفی پنی‌سیلین جهت درمان عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* سرعت مرگ و میر در اثر عفونت‌های ناشی از این سویه‌هادر حدود ۸۰٪ بود(۸). *استافیلوکوکوس اورئوس* به دلیل قدرت تخریب بالقوه و مقاومت فزاینده در برابر داروهای ضد باکتریایی به یکی از نگرانی های سلامت عمومی مبدل شده است. در سال ۱۹۴۲، دو سال پس از معرفی پنی‌سیلین برای مصرف پزشکی، اولین سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم در بیمارستان مشاهده شد و پس از آن سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین در جوامع نیز مشاهده شد(۲). از سال ۱۹۶۰ حدود ۸۰٪ از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*نسبت به پنی‌سیلین مقاوم بودند. در سال ۱۹۶۱، تنها یک سال پس از معرفی متی‌سیلین، مقاومت به این آنتی-بیوتیک مشاهده شد و این مقاومت در نتیجه وجود ژن *mecA* گزارش شد. در حال حاضر به جز درصد کمی از سویه های *استافیلوکوکوس ارئوس* تمام آنها آنزیم بتا-لاکتاماز تولید می‌کنند و نسبت به پنی‌سیلین‌ها مقاوم هستند. با مشاهده اولین سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی-سیلین در سال ۱۹۶۱، به تدریج میزان شیوع عفونت‌های بیمارستانی و مرگ و میر ناشی از این عوامل، به شدت رو به افزایش نهاد و در طول ۴۵ سال اخیر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین اکتسابی از بیمارستان در سراسر جهان گزارش شدو از سال ۱۹۹۰ سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین اکتسابی از جامعه که شاخص آنها وجود توکسین پنتون والنتین لوکوسیدین است، از سراسر جهان گزارش شد(۲).

این مطالعه با هدف تعیین سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین مولد بیوفیلم جدا شده از افراد سالم و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌ها به انجام رسیده است.

روش‌کار

جهت انجام این مطالعه در طی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۲ در مجموع ۲۰۰ فرد سالم که در شش ماه گذشته به پزشک یا مرکز درمانی مراجعه نکرده و با بیماری که در بیمارستان یا مرکز درمانی بستری بوده سروکار نداشته و نیز در این مدت آنتی‌بیوتیکی مصرف نکرده بودند انتخاب شدند. با استفاده از سوآپ آغشته به سرم فیزیولوژی استریل، از نواحی ساعد، بازو و زیربغل (دست غیر غالب) افراد نمونه‌گیری شد سپس سوآپ‌ها به محیط Thioglycollate broth (Merck, Germany) منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، نمونه‌ها بر روی محیط Mannitol Salt Agar (Merck, Germany) کشت داده شدند. جهت تأیید سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از آزمون‌های رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، مقاومت به نمک ۱۵-۱۰ درصد، DNase و PYR استفاده گردید(۹). سپس سویه‌هایی که به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* شده بودند، به روش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی تأیید شدند.

بررسی تولید بیوفیلم به روش کیفی سویه‌ها بر روی محیط Congo Red agar (Merck, Germany) واجد ۴۰ گرم در لیتر سوکروز کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند(۱۰). کلنی‌های سیاه رنگ به عنوان سویه‌های مولد بیوفیلم و کلنی‌های قرمز تیره به عنوان سویه‌های مولد بیوفیلم ضعیف و سویه‌های قرمز روشن تا صورتی به عنوان سویه‌های فاقد قدرت تولید بیوفیلم شناسایی شدند.

بررسی تولید بیوفیلم به روش کمی میکروتیتر پلیت این روش مبتنی بر سنجش میزان بیوفیلم تولیدی در محیط Trypticase Soy broth (Merck, Germany) واجد ۰/۲۵ درصد و در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه (Greiner, Louis, MO, USA) با استفاده از اسپکتروفتومتر است. این روش کمی بوده که بر اساس میزان چسبندگی کلنی‌های باکتریایی به سطوح پلی استیرن ته چاهک‌ها و رنگ آمیزی با کریستال ویوله و قرائت OD_{570} نانومترآنها با استفاده از دستگاه ELISA reader (Stat fax-2100) است(۱۱). سویه‌هایی که OD آنها زیر ۰/۳۵ بود غیرچسبنده، بین ۰/۳۵ تا ۰/۴۵ چسبنده ضعیف و سویه‌هایی که OD آنها بالاتراز ۰/۴۵ بود به عنوان چسبنده قوی در نظر گرفته شدند.

سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد بیوفیلم از نظر مقاومت نسبت به ۱۶ آنتی‌بیوتیک به روش دیسک دیفیوژن با استفاده از استانداردهای Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) و محیط Muller Hinton agar (Merck, Germany) واجد ۴ درصد نمک بررسی شدند(۱۲). آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده شامل: آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، اگزاسیلین (۱ میکروگرم)، پنی‌سیلین (۱۰ واحد)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، ریفامپین (۵ میکروگرم)، سولفامتوکسازول/تری‌متوپریم (۲۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، کانامایسین (۳۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، کینوپریستین/دالفوپریستین (۱۵ میکروگرم)، لینزولید (۳۰ میکروگرم) و مینوسایکلین (۳۰ میکروگرم) بودند. تمامی دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده در این مطالعه متعلق به شرکت BBL (Sparks, MD, USA) بود. جهت تعیین حداقل غلظت مهارکننده از رشد آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین و اگزاسیلین از روش Broth Micro-dilution بر اساس استانداردهای CLSI استفاده شد(۱۳).

جهت استخراج DNA از سویه‌های مولد بیوفیلم، از روش Boiling استفاده شد(۱۴). برای این منظور، چند کلنی از باکتری در ۲۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی حل شد و به خوبی ورتکس گردید سپس به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد. پس از ۱۵ دقیقه سانتریفوژ در 13000×g، ۱۰ میکرولیتر از سوپرناتانت به عنوان الگوی DNA در آزمون PCR استفاده گردید.

جهت تأیید سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از آزمون PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی *nuc* طراحی شده توسط Zouharova و هم کاران

استفاده شد(۱۵). تکثیر ژن *nuc* با مخلوطPCR و چرخه حرارتی طراحی معرفی شده توسط Zouharova و هم کاران انجام گرفت.

جهت تعیین وجود ژن‌های *icaA* و *icaD* از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی معرفی شده توسط Arciola و هم کاران استفاده گردید(۱۶). تکثیر این ژن‌ها با مخلوط PCR و چرخه حرارتی معرفی شده توسط Arciola و هم کاران استفاده گردید.

جهت پروفاژ تایپینگ سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از Multiplex-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی پروفاژ تایپ‌های SGA، SGB، SGF، SGD و SGL و هم چنین ساب تایپ‌های SGFa و SGFb استفاده گردید(۱۷). جهت تهیه مخلوط و چرخه حرارتی از دستورالعمل معرفی شده توسط رحیمی و هم کاران استفاده گردید(۱۸).

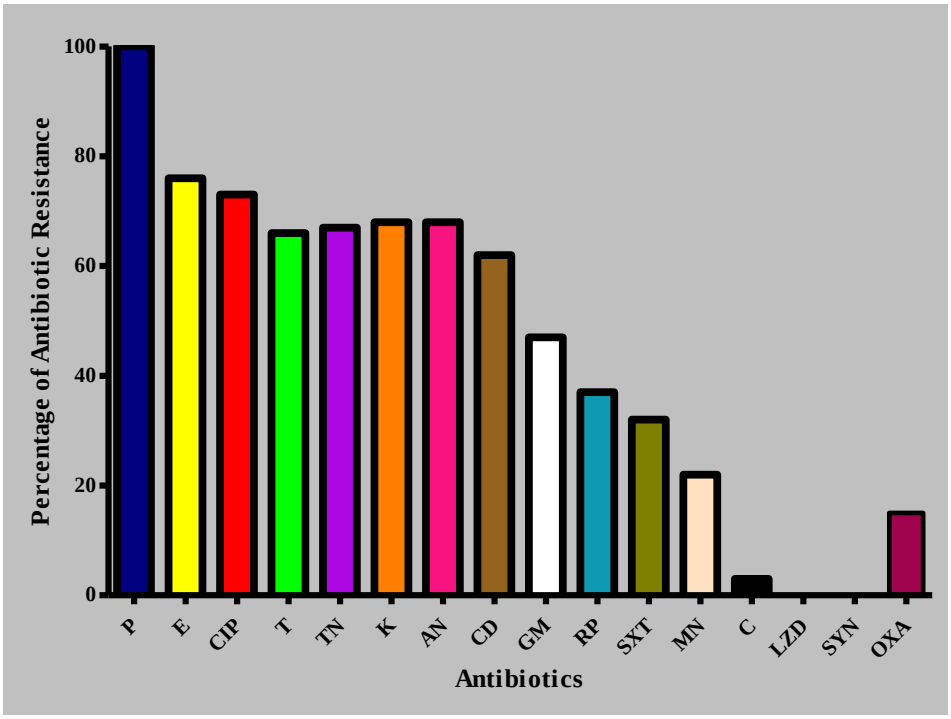
تعیین معنی دار اختلاف ها با آزمون مربع کای انجام و $P < ۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

در این مطالعه در مجموع ۲۰۰ فرد سالم که متشکل از ۱۰۰ زن و ۱۰۰ مرد سالم بودند انتخاب شدند. ۷۹ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* از این افراد جدا گردید. بدین ترتیب که ۴۷ سویه (۵۹٪) از مردان و ۳۲ سویه (۴۱٪) نیز از زنان جدا گردید. تمامی این سویه‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و آزمون PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی *nuc* شناسایی و تأیید شدند.

از ۷۹ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده پس از کشت بر روی محیط کنگورد آگار، ۳۷ سویه (۴۷٪) کلنی‌های سیاه رنگ (بیوفیلم مثبت)، ۱۸ سویه (۲۳٪) کلنی‌های قرمز رنگ (نامشخص) و ۲۴ سویه (۳۰٪) نیز کلنی‌های قرمز روشن (بیوفیلم منفی) تشکیل دادند. در این بررسی ۳۷ سویه (۴۷٪) به عنوان سویه‌های چسبنده، ۱۶ سویه (۲۰٪) به عنوان سویه‌های چسبنده ضعیف و ۲۶ سویه (۳۳٪) نیز به عنوان سویه‌های غیرچسبنده تعیین گردیدند.

از ۷۹ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از افراد سالم، ۱۲ سویه (۱۵٪) مقاوم به متی‌سیلین بودند. این ۱۲ سویه مقاوم به متی‌سیلین، همگی جزو سویه‌های مولد بیوفیلم (کلنی سیاه رنگ و چسبنده) بودند. بیش ترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین (۷۶٪) و سیپروفلوکساسین (۷۳٪) مشاهده گردید. مقاومت نسبت به کانامایسین، آمیکاسین، توبرامایسین، تتراسایکلین و کلیندامایسین نیز بیش از ۶۲٪ بود. هیچ کدام از سویه‌ها نسبت به لینزولاید، سینرسید و ونکومایسین مقاومتی نشان ندادند(نمودار ۱).



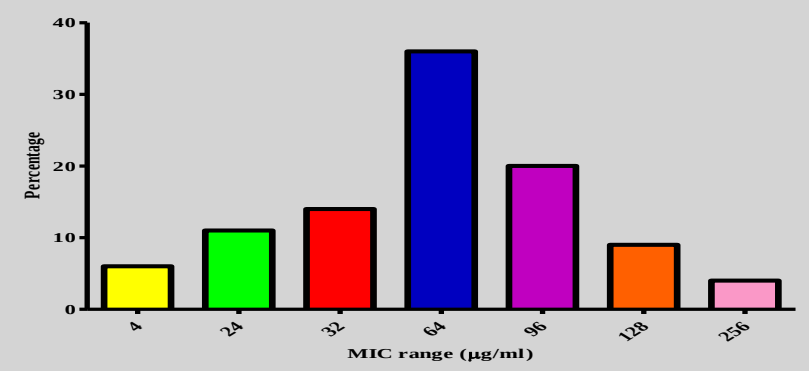
نمودار ۱. درصد مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس

در میان سویه‌های بیوفیلم مثبت اختلاف معنی داری در میزان مقاومت نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها، به استثنای جنتامایسین، ریفامپیسین، مینوسایکلین و کوتریموکسازول، نسبت به سویه‌های بیوفیلم منفی وجود داشت(جدول ۱). در سویه‌های بیوفیلم مثبت، ۵ سویه نسبت به تمامی یک آنتی‌بیوتیک‌ها به استثنای پنی‌سیلین حساسیت نشان دادند و همچنین سویه نیز تنها نسبت به پنی‌سیلین و اریترومایسین و ۷ سویه نیز نسبت به ۳ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، اریترومایسین و سیپروفلوکساسین مقاومت نشان دادند.

جدول ۱. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان سویه‌های بیوفیلم مثبت و بیوفیلم منفی استافیلوکوکوس آرئوس

آنتی بیوتیک	بیوفیلم مثبت		بیوفیلم منفی		*P* value
	مثبت	درصد	مثبت	درصد	
پنی‌سیلین	۵۳	۱۰۰	۲۶	۱۰۰	-
اریترومایسین	۴۸	۹۱	۱۲	۴۶	< 0.0001
سیپروفلوکساسین	۴۷	۸۹	۱۱	۴۲	< 0.0001
تتراسایکلین	۳۹	۷۳	۱۳	۵۰	< 0.0001
توبرامایسین	۴۰	۷۵	۱۳	۵۰	0.0004
آمیکاسین	۴۰	۷۵	۱۴	۵۴	0.003
کانامایسین	۴۰	۷۵	۱۴	۵۴	0.003
کلیندامایسین	۳۷	۷۰	۱۲	۴۶	0.0009
جنتامایسین	۲۷	۵۱	۱۰	۳۸	0.0875
ریفامپیسین	۱۸	۳۴	۱۱	۴۲	0.3078
کوتریموکسازول	۱۶	۳۰	۹	۳۵	0.5461
مینوسایکلین	۱۲	۲۳	۵	۱۹	0.6029
اگزاسیلین	۱۲	۲۳	-	-	< 0.0001
کلرامفنیکل	۲	۴	-	-	< 0.0001
لینزولاید	-	-	-	-	-
سینرسید	-	-	-	-	-

در ازمون تعیین حداقل میزان مهارکننده رشد باکتری، مشخص گردید که ۵ سویه (۶٪) نسبت به غلظت پایین اگزاسیلین(MIC برابر ۴ میکروگرم در میلی لیتر) مقاومت هستند(نمودار ۲). همچنین ۱۰ سویه (۱۳٪) نیز از مقاومت بالایی(MIC برابر یا بیش از ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر) نسبت به اگزاسیلین برخوردار بودند. هیچکدام از سویه‌ها نسبت به ونکومایسین مقاومتی نشان ندادند.



نمودار ۲. حداقل غلظت مهارکننده اگزاسیلین

تمام ۵۳ سویه مولد بیوفیلم دارای ژن های *icaA* و *icaD* بودند و *نتایج آزمون‌های فنوتیپی و ژنوتیپی کاملا منطبق بر یکدیگر بود. براساس* پروفاژ تایپینگ ۳ پروفاژ تایپ SGA (۶٪)، SGB (۳۰٪) و SGF (۱۰۰٪) هم راه با ۲ ساب تایپ SGFa (۱۰۰٪) و SGFb (۱۰۰٪) شناسایی شد(جدول ۲). همچنین ۳ الگوی پروفاژی نیز شناسایی گردید که الگوی شماره ۳ به عنوان الگوی غالب در میان سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس و مقاوم به متی‌سیلین شناسایی گردید. همچنین الگوی شماره ۱ تنها در میان سویه‌های مولد بیوفیلم مشاهده گردید. این سویه‌های تنها نسبت به پنی‌سیلین مقاومت نشان دادند و پایین ترین میزان مقاومت نسبت به اگزاسیلین را داشتند.

جدول ۲. فراوانی الگوهای پروفاژی مختلف در میان سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس

الگوی پروفاژی	پروفاژ تایپ					فراوانی	درصد
	SGA	SGB	SGF	SGFa	SGFb		
۱	+	+	+	+	+	۵	۶
۲	-	+	+	+	+	۱۹	۲۴
۳	-	-	+	+	+	۵۵	۷۰

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس فلور طبیعی انسان است و در قسمت قدامی مجرای بینی افراد به وفور مشاهده می‌شود و در مقایسه با استافیلوکوک-های کواگولاز منفی از قدرت بیماری زایی بیش تری به واسطه داشتن عوامل حدت بیش تر، برخوردار است. امروزه مشخص شده است که *استافیلوکوکوس اورئوس* همانند *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* قدرت بالایی جهت تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح وسایل خارجی دارد(۱, ۳, ۴). استعداد بالای سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در کسب ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی از سایر باکتری‌ها و درنتیجه افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در کنار قدرت بالای بیماری زایی و ایجاد بیوفیلم به یک نگرانی عمده در سلامت بیماران مبدل شده است.

در این مطالعه شیوع سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی-سیلین جدا شده از سطح پوست افراد سالم ۱۵ درصد بود که بسیار کمتر از سایر گزارشات است(۲, ۱۴, ۲۳-۱۸). در مقایسه با سایر مطالعات شیوع پایین این مقاومت می‌تواند ناشی از منبع بررسی باشد که افراد سالم هستند. این افراد به گونه‌ای انتخاب شده بودند که در طی ۶ ماه گذشته هیچ گونه مراجعه‌ای به پزشک و سایر مراکز درمانی نداشتند، آنتی‌بیوتیک مصرف نکرده‌بودند و همچنین با بیماران بستری در مراکز درمانی نیز سروکار نداشتند. بنابراین شیوع پایین سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین ناشی از پایین بودن تماس این افراد با سویه‌های بیمارستانی است که طبیعتا از مقاومت بالایی نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها برخوردار می‌باشند.

در این مطالعه میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین بسیار بالا بود و ۱۰۰ درصد سویه‌های بیوفیلم مثبت و منفی نسبت به این آنتی-بیوتیک مقاومت نشان دادند. همچنین در میان سویه‌های بیوفیلم مثبت میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین، توبرامایسین، کانامایسین، کلرامفنیکل، آمیکاسین و کلیندامایسین به طور مشخصی بالاتر از سویه‌های بیوفیلم منفی بود. به طور کلی مقاومت در ایران نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مذکور بالا است (۲, ۱۴،۲۳-۱۸). در میان سویه‌های بیوفیلم منفی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپیسین و کوتریموکسازول بالاتر از سویه‌های بیوفیلم مثبت بود.

هیچ کدام از سویه‌های بیوفیلم مثبت و منفی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، سینرسید و لینزولاید مقاومتی نشان دادند و به نظر می‌رسد که این ۳ آنتی‌بیوتیک می‌توانند به عنوان مؤثرترین عوامل ضد میکروبی جهت درمان عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد استفاده قرار گیرند. این یافته منطبق بر سایر گزارشات از ایران است که در آن مطالعات نیز هیچ گونه مقاومتی نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها گزارش نشده است(۲, ۱۴, ۲۴-۱۸). اما در ایتالیا مقاومت نسبت به سینرسید در میان سویه‌های مولد بیوفیلم گزارش شده است(۳). یکی از دلایل عدم گزارش مقاومت نسبت به این ۳ آنتی‌بیوتیک در ایران می‌تواند ناشی از عدم استفاده شدید از آنها جهت درمان عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* باشد.

تمامی سویه‌های مولد بیوفیلم دارای هر دو ژن *icaA* و *icaD* بودند. این یافته بر خلاف سایر گزارشات از آسیا و اروپا است که در آنها انطباق کامل میان تشکیل بیوفیلم به روش‌ها کمی و کیفی و ژنوتایپ آنها وجود ندارد(۳, ۲۵, ۲۶)؛ اما در برخی از گزارشات نیز هر دو ژن *icaA* و *icaD* در میان ۱۰۰ درصد سویه‌های مولد بیوفیلم گزارش شده‌اند(۴, ۲۷, ۲۸). یافته‌های این مطالعه مؤید اهمیت ژن‌های *icaA* و *icaD* در تشکیل بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس* است که منطبق بر یافته‌های Arciola و هم کاران(۱۶) و Gad و هم کاران(۴) است.

در این مطالعه موفق به شناسایی ۳ پروفاژ تایپ SGA، SGB و SGF و هم چنین دو ساب تایپ SGFa و SGFb شدیم. نیز ۳ الگوی پروفاژی در این مطالعه شناسایی گردید. در مطالعات پیشین در ایران نیز این پروفاژ تایپ‌ها و ساب تایپ‌ها شناسایی شده بودند(۲, ۱۸, ۲۲, ۲۴). در آمریکا و جمهوری چک نیز گزارشاتی از جداسازی پروفاژ تایپ‌های مختلف در اختیار می باشند(۱۷, ۲۹). هم چنین در طی سال‌های ۲۰۱۴-۲۰۱۲، چهار و هشت الگوی پروفاژی در ایران گزارش شده است که با توجه به این که آن گزارشات مبتنی بر نمونه‌های بیمارستانی بودند، می‌توان نتیجه

گیری کرد که تنوع بیش تری در میان سویه‌های جدا شده از بیمارستان در مقایسه با افراد سالم وجود دارد. به طور کلی به نظر می‌رسد اختلاف مشاهده شده در میان الگوهای پروفاژی و همچنین انواع مختلف پروفاژ تایپ‌های شناسایی شده با توجه به شرایط جغرافیایی و محل‌های نمونه-گیری و هم چنین خصوصیات و ویژگی‌های سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در حال گردش در جوامع مختلف، می‌توانند متفاوت باشند.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ۵ سویه *استافیلوکوکوس اروئوس* مولد بیوفیلم نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده به استثنای پنی‌سیلین حساسیت نشان دادند و همچنین آزمون تعیین حداقل غلظت مهارکننده آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین نشان دهنده پایین‌ترین میزان مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک بود. در گزارش قبلی از ایران(۲) نشان دادیم که این سویه‌ها با توجه به دارا بودن پروفاژ تایپ SGA و هم چنین SCC*mec* تایپ IV و تایپ ۲ *ccr* و هم چنین ژن *pvl* به عنوان سویه-های اکتسابی از جامعه شناخته می‌شوند و وجود پروفاژ تایپ SGA می تواند به عنوان شاخص جدیدی در سویه‌های CA-MRSA مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه گیری

بر اساس اطلاعات موجود، این مطالعه نخستین گزارش از جداسازی سویه-های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد بیوفیلم در میان افراد سالم در ایران است. نتایج حاصل از این مطالعه مؤید شیوع سویه‌های بیمارستانی در میان افراد سالم در جامعه شهری کشور است. وجود چنین سویه‌هایی با قدرت تشکیل بیوفیلم و همچنین مقاومت نسبت به طیف وسیعی از آنتی-بیوتیک‌ها و دارا بودن پروفاژ تایپ‌های مختلف که خود رمز کننده طیف وسیعی از عوامل حدت در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* هستند، نشان دهنده خطر بالقوه این سویه‌های بیماریزا در افراد سالم است.

تقدیر و تشکر

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی و فنآوری دانشگاه اصفهان، شماره ۹۲۰۴۱۱، به انجام رسیده است.

REFERENCES

1- 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.

2- 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(Pt 6):796-804.

3- 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.

4- Gad GFM, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H ,El-Baky RMA. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and Staphylococcus epidermidis isolated from urinary tract catheterized patients. The Journal of Infection in Developing Countries. 2009;3(05):342-51.

5- Gould I .Costs of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and its control. International Journal of Antimicrobial Agents. 2006;28(5):379-84.

6- Olson ME, Slater SR, Rupp ME, Fey PD. Rifampicin enhances activity of daptomycin and vancomycin against both a polysaccharide intercellular adhesin (PIA)-dependent and-independent *Staphylococcus epidermidis* biofilm. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2010;65(10):2164-71.

7- Biswas R, Voggu L, Simon UK, Hentschel P, Thumm G, Götz F. Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. FEMS Microbiology Letters. 2006;259(2):260-8.

8- Bell JM, Turnidge JD. High prevalence of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients in Asia-Pacific and South Africa: results from SENTRY antimicrobial surveillance program, 1998-1999. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2002;46(3):879-81.

9- 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.

10- Knobloch JK-M, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Medical Microbiology and Immunology. 2002;191(2):101-6.

11- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. Journal of Microbiological Methods. 2008;72(2):157-65.

12- Clinical and Laboratory Standard Institute C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 16th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2006.

13- Clinical and Laboratory Standard Institute C .Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A7. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2006.

14- Rahimi F, Bouzari M, Maleki Z, Rahimi F. Antibiotic susceptibility pattern among Staphylococcus spp. with emphasis on detection of *mecA* gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases. 2009;4(3):143-50.

15- Zouharova M, Rysanek D. Multiplex PCR and RPLA Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains from bulk tank milk. Zoonoses and public health. 2008;55(6):313-9.

16- Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Donati ME, Baldassarri L, Montanaro L. Occurrence of ica genes for slime synthesis in a collection of *Staphylococcus epidermidis* strains from orthopedic prosthesis infections. Acta Orthopaedica. 2003;74(5):617-21.

17- 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):1689-703.

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): 1807-1811.

19- Fatholahzadeh B, Emaneini M, Gilbert G, Udo E, Aligholi M, Modarressi MH, *et al*. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCC*mec*) analysis and antimicrobial susceptibility patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates in Tehran, Iran. Microbial Drug Resistance. 2008;14(3):217-20.

20- Japoni A, Jamalidoust M, Farshad S, Ziyaeyan M, Alborzi A, Japoni S, *et al*. Characterization of SCC*mec* types and antibacterial susceptibility patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern Iran. Japanese Journal of Infectious Diseases. 2011;64(1):28-33.

21- Javidnia S, Talebi M, Saifi M, Katouli M, Rastegar Lari A, Pourshafie MR. Clonal dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients and the hospital environment. International Journal of Infectious Diseases. 2013;17(9):e691-695.

22- 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.

23- Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Antibiotic resistance pattern of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* isolates in Tehran, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013;6(2):144-9.

24- 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.

25- 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.

26- Mirzaee M, Ghasemian SNPA-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.

27- De Silva G, Kantzanou M, Justice A, Massey R, Wilkinson A, Day N, *et al*. 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;40(2):382-8.

28- Mack D, Rohde H, Dobinsky S, Riedewald J, Nedelmann M, Knobloch JK-M, *et al*. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. Infection and Immunity. 2000;68(7):3799-807.

29- Workman M, Nigro O, Steward G. Identification of prophages in coastal water isolates of *Staphylococcus aureus*. J Young Invest. 2006;15:1-8.