تشکیل بیوفیلم در میان سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جداشده از افراد سالم در اصفهان

فاتح رحیمی[۱]*، مریم دانش[۲]

۱-دکتری تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروب شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۲-کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

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

دریافت مقاله: دی نود و شش پذیرش برای چاپ: بهمن نود و شش

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به عنوان نرمال بیوتای ساکن پوست انسان شناخته می شود که بر خلاف استافیلوکوکوس اورئوس فاقد عوامل حدت مختلف جهت بیماری زایی است؛ بنابراین تشکیل بیوفیلم به عنوان تنها عامل بیماری زایی در این باکتری باید مورد بررسی قرار گیرد. کم توجهی به این دسته از باکتریهای نرمال بیوتای انسانی مولد بیوفیلم که از مقاومت بالا یی نسبت به کلاسهای مختلف آنتی بیوتیکی برخوردار می باشند یک تهدید عمده برای بهداشت عمومی به شمار می رود. این مطالعه با هدف جداسازی و بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مولد بیوفیلم جداسازی شده از افراد سالم در شهر اصفهان در سال ۱۳۹۵ به انجام رسیده است.*

روش کار: *جهت انجام نمونه گیری ۱۰۰ فرد سالم انتخاب شدند و تمامی جدایه ها با استفاده از پرایمر اختصاصی تا حد گونه مورد شناسایی قرار گرفتند و توانایی تشکیل بیوفیلم در میان آنها با ترکیبی از روشهای کیفی کنگو رد آگار و روش کمی میکروتیتر پلیت مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این، حضور ژنهای icaABCD، aap و IS256 با استفاده از آزمون PCR مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته ها: *با استفاده از آزمون PCR تمامی ۱۲۳ سویه جداسازی شده مورد تأیید قرار گرفتند. در سنجش کمی بیوفیلم، ۱۲/۲ درصد سویه ها قابلیت اتصال قوی به سطح پلی استیرن میکروپلیتها را داشتند. از سوی دیگر، ۶/۵ درصد سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس قادر به تشکیل کلنی مشکی در پلیتهای کنگو رد آگار بودند و به عنوان سویه های اسلایم مثبت شناسایی شدند. حضور ژنهای icaA، icaB، icaD، IS256 و aap به ترتیب محدود به ۳/۳، ۳/۳، ۳/۳، ۰ و ۵۲ درصد سویه ها بود.*

نتیجه گیری: *نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده انتشار سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مولد بیوفیلم در میان افراد سالم در شهر اصفهان است. با توجه به اینکه در نمونه های بالینی معمولا سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به‌عنوان سویه های آلوده کننده شناخته می شوند؛ لذا شناسایی صحیح این سویه ها در نمونه های بالینی می تواند کمک شایانی به متخصصان در تشخیص عفونتهای بالینی نماید. حضور ژنهای icaA، icaD همراه با شیوع بالای ژن aap در میان سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس تولید کننده بیوفیلم نشان دهنده این مطلب است که قابلیت ایجاد ica و aap و بیوفیلم به طور مشترک در کلونیهای خاص استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مشاهده می شود و به صورت ترجیهی در بیمارستان و جامعه منتشر می شود.*

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، بیوفیلم، ica، aap، IS256، کنگو رد آگار، آزمون میکروتیترپلیت

مقدمه

غالباً کوکسی‌های گرم مثبت و به خصوص جنس *استافیلوکوکوس* مسئول عوارض عفونی جراحی پیوند عروق و یا کاشت ایمپلنت محسوب می شوند. در گذشته استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی غیربیماری زا و در آزمایشگاه ها به عنوان آلودگی در نظر گرفته می شدند (۱). در طی ۲ دهه گذشته، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و سایر استافیلوکوکهای کواگولاز منفی از مهمترین عوامل ایجاد عفونتهای بیمارستانی و همچنین عوامل تهدیدکننده سلامت به - شمار می‌روند. استافیلوکوکهای کواگولاز منفی و به ویژه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* از مهمترین عوامل ایجاد عفونت در بیمارانی محسوب می شوند که از ابزارهای پزشکی خارجی مانند سوندهای ادراری، کاتترهای وریدی، پروتز، ایمپلنتهای

دندانی و دریچه های مصنوعی قلب استفاده می کنند (۲). همچنین، در سالهای اخیر بروز اپیدمی استافیلوکوکی از چندین بیمارستان در دنیا گزارش شده است. در بسیاری از موارد این باکتریها به عنوان سومین عامل ایجاد عفونت بیمارستانی مطرح شده‌اند (۳). اغلب، عفونتهای حاصل از *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم و عودشونده می باشند (۱) و علت اصلی بیماری زایی آنها قابلیت چسبیدن و تشکیل بیوفیلم بر سطح ابزارهای پزشکی می - باشد (۴). بر اساس گزارش انستیتو ملی سلامت (NIH)، عفونتهای باکتریایی انسان تا ۸۰ درصد مربوط به بیوفیلم میکروارگانیسمها است. برآورد شده است که در حدود ۴۰ تا ۵۰ درصد عفونتهای دریچه مصنوعی قلب و ۵۰ تا ۷۰ درصد عفونتهای بیوفیلمی ناشی از سوند را *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ایجاد می کنند (۵). شیوع جدایه های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم به متی سیلین و مقاوم به ونکومایسین، درمان عفونتهای این باکتریها را بسیار پیچیده کرده است (۱).

بیوفیلم بیانگر یک جامعه است که در آن ارتباطات درونی بین گروه های مختلف وجود دارد. بیوفیلم می تواند از یک گونه و یا گونه های مختلف میکروبی تشکیل شود. آنها می توانند بر روی سطوح متفاوتی از زنده یا غیرزنده تشکیل شوند. سطوح فولاد ضد زنگ، شیشه، پلاستیک و پلی پروپیلن می توانند توسط باکتریهای بیماری زا یا ضایعات آنها آلوده شوند؛ که در نتیجه اتصال آنها به سطح و آغاز رشد سلول منجر به تشکیل بیوفیلم می گردد (۶). بیوفیلم را می توان به عنوان ماتریکسی در نظر گرفت که جمعیتهای باکتریایی متصل به هم و متصل به سطوح را دربر می گیرد. این ماتریکس آلی ارگانیسمهای متصل را محافظت می کند. به‌طور کلی بیوفیلم شامل باکتری‌ها در یک ماتریکس پلی ساکاریدی، پروتئین و اسید نوکلئیک می باشد که باعث محافظت آنها در برابر آنتی بیوتیکها و عملکرد سیستم ایمنی میزبان می گردد؛ در نتیجه یک عامل مهم در توسعه عفونت مزمن و عودشونده به شمار می رود (۷, ۸). برای تشکیل یک بیوفیلم با دوام، نیاز به حضور کانالهایی برای نفوذ مواد مغذی به لایه های عمیق‌تر بیوفیلم و همچنین سایر عوامل فرعی است که باعث اختلال در عملکرد سلول به سلول می شوند. در نهایت این عوامل منجر به جدا شدن از سلول و در نتیجه کنترل ضخامت و گسترش بیوفیلم می گردند. مواد پلیمری خارج سلولی (EPS) در تشکیل بیوفیلم، باکتریها را از عوامل ضدمیکروبی و سیستم ایمنی بدن میزبان محافظت کرده و در دوام عفونت بیوفیلم نیز مؤثر است (۴). این مطالعه با هدف جداسازی و بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی سویه های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مولد بیوفیلم از سطح بدن افراد سالم در شهر اصفهان در سال ۱۳۹۵به انجام رسیده است.

روش کار

جهت انجام این بررسی در طی ماه های اردیبهشت و خرداد ۱۳۹۵ نمونه گیری از ۱۰۰ فرد سالم شامل ۵۰ مرد و ۵۰ زن در شهر اصفهان انجام گرفت. این افراد در طی ۶ ماه گذشته به پزشک و مراکز درمانی مراجعه نکرده و تحت درمان آنتی بیوتیکی نیز قرار نگرفته بودند. جهت انجام نمونه گیری با استفاده از سوآپ استریل آغشته به سرم فیزیولوژی استریل از بازو، زیر بغل و ساعد دست غیرغالب این افراد نمونه گیری به عمل آمد و نمونه ها در محیط تایوگلیکولات براث (Merck, Germany) قرار داده شده و به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه اصفهان منتقل شدند. محیطهای کشت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و سپس بر روی محیط مانیتول سالت آگار (Biolife, Italy) کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند پس از این مدت کلنیهای قرمز رنگ انتخاب شدند و جهت تأیید سویه های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با استفاده از آزمون PCR و پرایمرهای اختصاصی *gseA* مورد شناسایی گرفتند (۹).

جهت غربالگری و بررسی تشکیل اسلایم به روش کیفی از آزمون کنگو رد آگار بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده گردید. برای این منظور باکتریها بر روی محیط کشت کنگو رد آگار کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۲۴ ساعت در دمای محیط انکوبه شدند. پس از این مدت تغییر رنگ کلنیها مورد بررسی قرار گرفت و باکتریها به ۳ دسته اسلایم مثبت (مشکی رنگ)، اسلایم منفی (قرمز روشن) و اسلایم کاذب یا مشکوک (قرمز تیره) تقسیم بندی شدند (۱۰).

به منظور تعیین کمی تشکیل بیوفیلم در میان سویه های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در میان سویه هایی که در آزمون کنگو رد آگار به عنوان بیوفیلم مثبت و بیوفیلم مشکوک انتخاب شده بودند از آزمون میکروتیتر پلیت با استفاده از دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده گردید (۱۰). در این آزمون پلیتها با استفاده از خوانشگر الایزا و در طول موج ۵۷۰ نانومتر مورد بررسی و تفسیر قرار گرفتند: بیوفیلم قوی ($OD_{570} \geq 0.5$)، بیوفیلم منفی ($OD_{570} \leq ODc$)، بیوفیلم ضعیف ($OD_{570} < 0.2$) و بیوفیلم متوسط ($0.2 \leq OD_{570} < 0.5$).

جهت استخراج DNA در این مطالعه از آزمون جوشاندن بر اساس پروتکل رحیمی و همکاران با اندکی تغییرات استفاده شد (۱۱). بر این اساس میزان کمی از کشت تازه باکتری به ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، در میکروتیوبهای استریل اضافه شد و به خوبی ورتکس گردید.

سپس میکروتیوبها به مدت ۲۰ دقیقه درون آب جوش قرار داده شدند و پس از آن، به مدت ۱۵ دقیقه در دور g × ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت واجد DNA به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت.

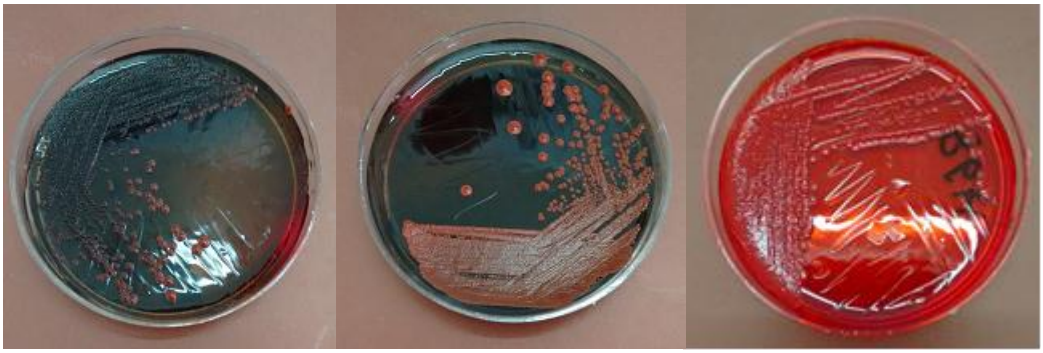
جهت شناسایی و تأیید سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی gseA و بر اساس پروتکل و سیکل حرارتی معرفی شده توسط Ikeda و همکاران استفاده گردید (۹).

جهت شناسایی ژنهای icaA و icaD (۱۲)، icaB، icaC، aap و IS256 (۱۳) از آزمون PCR با استفاده پرایمرهای اختصاصی هر ژن و بر اساس پروتکل و سیکل حرارتی که پیشتر ارائه شده است، استفاده گردید (۱۲, ۱۳).

یافته ها

جهت جمع آوری جدایه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از افراد سالم از بازوی ۵۰ مرد و ۵۰ زن در دانشگاه اصفهان نمونه گیری انجام گرفت که در مجموع ۲۴۲ جدایه مشکوک به استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جداسازی شدند. از این تعداد، ۱۲۳ سویه (۵۱ درصد) با استفاده از آزمون PCR به عنوان سویه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مورد شناسایی تأیید قرارگرفتند. در این میان، ۶۴ سویه (۵۲ درصد) متعلق به نمونه های خانمها و ۵۹ سویه (۴۸ درصد) نیز متعلق به آقایان بود.

پس از بررسی کلنی ها بر روی محیط کشت کنگو رد آگار مشخص گردید که از مجموع ۱۲۳ سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جداسازی شده از افراد سالم، ۸ سویه (۶/۵ درصد) واجد کلنی مشکی (اسلایم مثبت)، ۳ سویه (۲/۴ درصد) واجد کلنی‌های قرمز روشن و ۱۱۲ سویه (۹۱ درصد) واجد کلنی قرمز تیره (اسلایم کاذب یا مشکوک) بودند (تصویر ۱).



تصویر ۱- سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بر روی محیط کنگو رد آگار. ۱: اسلایم مثبت، ۲: اسلایم کاذب، ۳: اسلایم منفی

در سویه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جداسازی شده از افراد سالم ۵۹ سویه (۴۷/۹ درصد) فاقد قدرت تشکیل بیوفیلم بودند ($OD_{570} \leq ODc$). همچنین، ۴ سویه (۳/۳ درصد) بیوفیلم متوسط ($0.2 \leq OD_{570} < 0.5$)، ۱۵ سویه (۱۲/۲ درصد) بیوفیلم قوی ($OD_{570} \geq 0.5$) و ۴۵ سویه (۳۶/۶ درصد) بیوفیلم ضعیف ($OD_{570} < 0.2$) تشکیل دادند.

تنها ۴ سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مولد بیوفیلم واجد ۳ ژن icaA، icaB و icaD با وزنهای مولکولی به ترتیب ۱۸۸، ۵۲۷ و ۱۹۸ جفت باز بودند و ژن icaC در هیچکدام از سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس شناسایی نشد.

همچنین، نتایج حاصل از شناسایی ژنهای aap و IS256 نیز نشان داد که از مجموع ۶۴ سویه بیوفیلم مثبت، بیوفیلم متوسط و بیوفیلم ضعیف مورد بررسی در این مطالعه، تمامی سویه های واجد ژن aap بودند و در هیچکدام از ۵۹ سویه بیوفیلم منفی نیز ژن aap شناسایی نگردید. علاوه بر این، هیچکدام از ۱۲۳ سویه مورد مطالعه واجد ژن مربوط به ترانسپوزون IS256 نبودند و این ژن در هیچکدام از سویه ها شناسایی نشد. در جدول ۱ فراوانی ژن‌های مختلف درگیر در فرآیند تشکیل بیوفیلم در میان سویه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بر اساس نتایج آزمونهای کمی و کیفی تشکیل بیوفیلم آورده شده است.

جدول ۱- میزان شیوع ژنهای تشکیل دهنده بیوفیلم در سویه‌های افراد سالم در روش کنگو رد آگار و میکروتیتر پلیت.

ژن‌های دخیل در بیوفیلم	میکروتیتر پلیت				کنگو رد		
	بیوفیلم مثبت (٪)	بیوفیلم متوسط (٪)	بیوفیلم ضعیف (٪)	بیوفیلم منفی (٪)	اسلایم مثبت (٪)	اسلایم کاذب (٪)	اسلایم منفی (٪)
icaA	۴ (۲۶/۷)	-	-	۰	۴ (۵۰)	۰	۰
icaD	۴ (۲۶/۷)	-	-	۰	۴ (۵۰)	۰	۰
icaB	۴ (۲۶/۷)	-	-	۰	۴ (۵۰)	۰	۰
icaC	-	-	-	-	-	-	-
IS*256*	-	-	-	-	-	-	-
aap	۱۵ (۱۰۰)	۴ (۱۰۰)	۴۵ (۱۰۰)	-	۸ (۱۰۰)	۴۶ (۴۱)	۰

بحث

استافیلوکوکهای کواگولاز منفی و به ویژه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* از مهم‌ترین عوامل ایجاد عفونت در بیمارانی هستند که از ابزارهای پزشکی خارجی مانند سوندهای ادراری، کاتترهای وریدی، پروتز، ایمپلنتهای دندانی و دریچه های مصنوعی قلب استفاده می کنند (۲). در گذشته *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به عنوان باکتری کامنسال پوست در نظر گرفته می شد، در حالیکه در حال حاضر به عنوان یک بیماری زای مهم فرصت‌طلب شناخته شده است. عفونتهای ناشی از این باکتری غالباً بیمارستانی است و علت اصلی بیماری زایی آنها قابلیت چسبیدن و تشکیل بیوفیلم بر سطح ابزار پزشکی می باشد. باکتری به وسیله بیوفیلم از حضور آنتی بیوتیکها، استرسهای محیطی، پاسخهای ایمنی و عوامل فاگوسیت - کننده فرار می کند و در واقع بیوفیلم از باکتری محافظت می کند. پلی ساکارید چسبنده بین سلولی در تشکیل بیوفیلم و در چسبندگی سلول به سلول نقش دارد و سنتز پلی ساکارید چسبنده بین سلولی توسط محصولات مجموعه ژنهای کروموزومی *ica* می باشد که در یک ساختار اپرون سازمان یافته اند، صورت می گیرد. مطالعه در زمینه توانایی تشکیل بیوفیلم و مشخص نمودن ژنهای دخیل در این زمینه به درک بهتر فرآیند تشکیل بیوفیلم و به دنبال آن عفونتهای ناشی از آن کمک می کند. امروزه به منظور بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم از روش کیفی کنگو رد آگار و آزمون کمی میکروتیتر پلیت استفاده می شود. همچنین، می توان از روشهای مولکولی جهت تعیین ژنهای دخیل در تشکیل بیوفیلم نیز استفاده کرد که در واقع می توان با بررسی ژنهای دخیل در تشکیل بیوفیلم، احتمال تشکیل بیوفیلم را در عفونتهای مختلف پیش بینی کرد (۱, ۱۴, ۱۵).

در مطالعه حاضر ۱۲۳ سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جدا شده از افراد سالم پس از شناسایی تا حد گونه، از نظر قابلیت تشکیل بیوفیلم به صورت فنوتایپی و ژنوتایپی مورد بررسی قرار گرفتند. از لحاظ توانایی ایجاد اسلایم در سویه های افراد سالم ۶/۵ درصد اسلایم مثبت، ۹۱/۱ درصد اسلایم کاذب و ۲/۴ درصد نیز اسلایم

منفی بودند. از لحاظ قدرت اتصال به سطح پلی استیرن میکروپلیت نیز نتایج به این صورت بود که ۳/۳ درصد متوسط، ۱۲/۲ درصد بسیار قوی، ۳۶/۶ درصد ضعیف و ۴۷/۹ درصد فاقد قدرت چسبندگی بودند.

در ایران و نقاط مختلف دنیا تاکنون مطالعات متعددی در این زمینه به انجام رسیده است (۱۰, ۱۵-۲۱) که در بیشتر مطالعات از ناحیه بینی افراد سالم نمونه گیری به عمل آمده است. نتایج حاصل از آزمون کمی میکروتیتر پلیت و آزمون کیفی کنگو رد آگار در مطالعه حاضر کمتر از موارد گزارش شده در ایران بود که می تواند ناشی از انتخاب صحیح و دقیق افراد سالم در این مطالعه، محل نمونه گیری متفاوت و همچنین تفاوت در شهر محل نمونه گیری باشد. همچنین، نتایج حاصل کاملا مشابه با گزارشات Du و همکاران در سال ۲۰۱۳ در چین و Koselka و همکاران در سال ۲۰۰۹ در سوئد بود (۱۷, ۱۹). علاوه بر این، یافته های حاضر با نتایج محققین در سایر کشورها مغایرت داشت (۱۶, ۲۲-۲۶).

در مطالعات Galdbart و همکاران در سال ۲۰۰۰ در سوئد، اپرون *ica* در ۸۱/۵ درصد سویه های بالینی و ۱۷/۴ درصد سویه های جداشده از افراد سالم شناسایی گردید (۱۶). در مطالعه Garcia و همکاران در شیلی در سال ۲۰۰۴، ۲۶/۳۵ درصد از استافیلوکوکهای کواگولاز منفی واجد هر دو ژن *icaA* و *icaD* بودند و توانایی ایجاد باکتریمی داشتند؛ همچنین ۱۰/۲۷ درصد سویه ها واجد ژنهای *icaC* و*icaD* و فاقد توانایی ایجاد باکتریمی بودند. علاوه بر این ۸۱ درصد سویه ها نیز واجد توانایی تشکیل اسلایم بودند (۲). در مطالعه Satorres و همکاران در آرژانتین در سال ۲۰۰۷، از مجموع ۶۲ سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ۲۹ جدایه (۴۲ درصد) در روش کنگو رد آگار بیوفیلم مثبت بودند که ۴۸/۴ درصد از آنها واجد ژن *icaAD* بودند (۲۲). Montanaro و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ایتالیا نشان دادند که ۳۹ سویه (۵۵/۷ درصد) واجد اپرون *ica*، ۳۴ سویه (۴۸/۶ درصد) واجد ترانسپوزون IS*256* و ۳۱ سویه (۴۴/۳ درصد) نیز واجد ژنهای *ica* و IS*256* بودند (۲۷). Koskela و همکاران در سوئد در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که از ۳۲ سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ۴۷ درصد بیوفیلم مثبت بودند که در روش کنگو رد آگار ۲۸ درصد آنها توانایی تولید اسلایم را داشتند (۱۷). در سال ۲۰۰۹ Gad و همکاران در مصر شیوع ژنهای *icaA* و *icaD* را ۸۸/۶ درصد گزارش کردند (۲۴). در مطالعه Oliveira و همکاران در برزیل در سال ۲۰۱۰، در مجموع ۱۰۰ جدایه *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی مورد مطالعه قرار گرفت و فراوانی ژنهای *icaA* و *icaD* ۴۰ درصد گزارش گردید (۲۶).

نتایج بررسی فراوانی ژنهای دخیل در تشکیل بیوفیلم در مطالعه حاضر نشان داد که ژنهای *icaAD* در ۴ سویه افراد سالم (۳/۳ درصد) شناسایی شدند. همچنین، ژن *icaB* در ۴ سویه افراد سالم (۳/۳ درصد) مشاهده شدند و ژن *icaC* نیز در هیچ یک از سویه‌ها شناسایی نشد. علاوه بر این، ۶۴ سویه (۵۲ درصد) واجد ژن *aap* بودند. طبق بررسیهای انجام شده، نتایج حاصل از مطالعه حاضر پایینتر از گزارشات موجود در ایران و جهان است و با نتایج Liduma و همکاران در سال ۲۰۱۲ و Shahkarami و همکاران در سال ۱۳۹۳ مشابهت تقریبی دارد (۲۸-۳۰). عدم حضور ترانسپوزون IS*256* در میان سویه های مورد مطالعه می تواند مؤید مقاومت بالای این سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک جنتامایسین باشد (۱۴).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده انتشار سویه های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مولد بیوفیلم در میان افراد سالم در در شهر اصفهان است. شیوع سویه های مولد بیوفیلم در افراد سالم می‌تواند یک چالش مهم بهداشتی باشد. با توجه به اینکه در نمونه های بالینی معمولا سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به عنوان سویه های آلوده کننده شناخته می شوند؛ لذا شناسایی صحیح این سویه‌ها می تواند کمک شایانی به متخصصان در تشخیص عفونتها نماید. در این مطالعه جهت شناسایی جدایه ها از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد که می تواند با حساسیت و اختصاصیت بالا در کوتاه ترین زمان ممکن جدایه ها را شناسایی نماید. همچنین، استفاده توأم از آزمونهای کمی و کیفی و ژنوتایپی بررسی بیوفیلم می تواند کمک شایانی به شناسایی سویه های مولد بیوفیلم نماید. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ژنهای *icaA* و *icaD* ممکن است بتوانند نقش مهمی در تشکیل بیوفیلم در سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ایفا نمایند که می توان از این ژنها به عنوان هدف جهت شناسایی سویه های مولد بیوفیلم استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه در قالب بخشی از پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی با حمایت معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان به انجام رسیده است.

REFERENCES

1- O'gara JP, Humphreys H. Staphylococcus epidermidis biofilms: importance and implications.
2- Journal of Medical Microbiology. 2001;50(7):582-7.
3- García P, Benítez R, Lam M, Salinas AM, Wirth H, Espinoza C, et al. Coagulase-negative staphylococci: clinical, microbiological and molecular features to predict true bacteraemia. Journal of Medical Microbiology. 2004;53(1):67-72.
4- John JF, Harvin AM. History and evolution of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci: Susceptibility profiles of new anti-staphylococcal agents. Therapeutics and Clinical Risk Management. 2007;3(6):1143.
5- Gomes F, Leite B, Teixeira P, Oliveira R. Strategies to control *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. 2011;2:843-52.
6- Römling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. Journal of Internal Medicine. 2012;272(6):541-61.
7- da Silva Meira QG, de Medeiros Barbosa I, Athayde AJAA, de Siqueira-Júnior JP, de Souza EL. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. Food Control. 2012;25(2):469-75.
8- Fey PD, Olson ME .Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. Future Microbiology. 2010;5(6):917-33.
9- Kozitskaya S, Olson ME, Fey PD, Witte W, Ohlsen K, Ziebuhr W. Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing. Journal of Clinical Microbiology. 2005;43(9):4751-7.
10- Ikeda Y, Ohara-Nemoto Y, Kimura S, Ishibashi K, Kikuchi K. PCR-based identification of *Staphylococcus epidermidis* targeting *gseA* encoding the glutamic-acid-specific protease. Canadian Journal of Microbiology. 2004;50(7):493-8.
11- 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.
12- 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.
13- 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):2151-6.
14- Petrelli D, Zampaloni C, D'Ercole S, Prenna M, Ballarini P, Ripa S, et al. Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2006;25(12):773-81.
15- O'Gara JP. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiology Letters. 2007;270(2):179-188.
16- Rahimi F, Karimi S. Biofilm producing *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from clinical samples in Tehran, Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2016;11(3):e33343.
17- Galdbart J-O, Allignet J, Tung H-S, Rydèn C, El Solh N. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. Journal of Infectious Diseases. 2000;182(1):351-5.

18- Koskela A, Nilsdotter-Augustinsson Å, Persson L, Söderquist B. Prevalence of the ica operon and insertion sequence IS*256* among *Staphylococcus epidermidis* prosthetic joint infection isolates. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2009;28(6):655-60.
19- Cherifi S, Byl B, Deplano A, Nagant C, Nonhoff C, Denis O, et al. Genetic characteristics and antimicrobial resistance of Staphylococcus epidermidis isolates from patients with catheter-related bloodstream infections and from colonized healthcare workers in a Belgian hospital. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2014;13(1):20.
20- Du X, Zhu Y, Song Y, Li T, Luo T, Sun G, et al. Molecular analysis of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from community and hospital environments in China. PLoS One. 2013;8(5):e62742.
21- Eftekhar F, Mirmohamadi Z. Evaluation of biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates from nosocomial infections and skin of healthy volunteers. International Journal of Medicine and Medical Sciences. 2009;1(10):438-41.
22- Rahimi F, Arabestani MR. Biofilm production among *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from healthy people. Biological Journal of Microorganism. 2016;5(18):107-16.
23- Satorres SE, Alcaráz LE. Prevalence of *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and hospital staff. Central European Journal of Public Health. 2007;15(2):87-90.
24- Nasr RA, AbuShady HM, Hussein HS. Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. Egyptian Journal of Medical Human Genetics. 2012;13(3):269-74.
25- 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(5):342-51.
26- Pinheiro L, Brito CI, Pereira VC, Oliveira Ad, Camargo CH, Cunha MdLRd. Reduced susceptibility to vancomycin and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2014;109(7):871-8.
27- Oliveira A, Maria de Lourdes R. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. BMC Research Notes. 2010;3(1):260.
28- Montanaro L, Campoccia D, Pirini V, Ravaioli S, Otto M, Arciola CR. Antibiotic multiresistance strictly associated with IS*256* and ica genes in *Staphylococcus epidermidis* strains from implant orthopedic infections. Journal of Biomedical Materials Research. 2007;83(3):813-8.
29- Līduma I, Tračevska T, Bērs U, Žileviča A. Phenotypic and genetic analysis of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. Medicina (Kaunas, Lithuania). 2012;48(6):305-9.
30- Shahkarami F, Rashki S. Prevalence of ica operon related genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2016;9(4):16-23.
31- Pourmand MR, Abdossamadi Z, Salari MH, Hosseini M. Slime layer formation and the prevalence of *mecA* and *aap* genes in *Staphylococcus epidermidis* isolates. The Journal of Infection in Developing Countries. 2010;5(01):034-40.