

## بررسی فنوتایپی و ژنوتایپی تشکیل بیوفیلم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در یک بیمارستان در اصفهان در سال ۱۳۹۵

عاطفه کریمی، فاتح رحیمی

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه اصفهان

۲- دکترای تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، دانشگاه اصفهان

\*نشانی برای مکاتبه: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری های زیستی، بخش میکروبیولوژی، دریافت

مقاله: تیر نود و هشت پذیرش برای چاپ: شهریور نود و هشت

### چکیده

**سابقه و هدف:** استافیلوکوکوس اورئوس باعث ایجاد طیف گسترده ای از عفونتها در انسان از قبیل عفونت دستگاه ادراری می شود که ناشی از توانایی این باکتری در تشکیل بیوفیلم در نقاط مختلف دستگاه ادراری است. این مطالعه با هدف تعیین فنوتایپی و ژنوتایپی تشکیل بیوفیلم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در اصفهان انجام گرفته است. روش کار: در طی سال ۱۳۹۵، در مجموع ۹۶ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از یک بیمارستان مرجع در اصفهان جمع آوری شدند و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تا حد گونه شناسایی گردیدند. به منظور بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم در میان سویه ها از روشهای کیفی و کمی فنوتایپی ژلوز قرمز کنگو و میکروتیتر پلیت استفاده گردید و حضور ژنهای مختلف مؤثر بر تشکیل بیوفیلم در میان سویه ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تعیین گردید.

**یافته ها:** با استفاده از آزمون PCR تمامی جدایه ها به عنوان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مورد تأیید قرار گرفتند. در مجموع ۵ درصد و ۷۲ درصد سویه ها به ترتیب واحد کلنیهای سیاه رنگ و قرمز تیره بودند. نیز ۷۲ درصد سویه ها به عنوان بیوفیلم مثبت شناسایی شدند. فراوانی ژنهای *icaA*، *icaD*، *clfA*، *fnbA* و *cna* نیز در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مولد بیوفیلم به ترتیب ۸۴، ۸۶، ۷۵، ۶۱ و ۴۳ درصد بود.

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان دهنده شیوع بالای سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مولد بیوفیلم در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری در بیمارستان مورد نظر است. همچنین، این یافته ها نشان دهنده اهمیت روش ژنوتایپی در مقایسه با روشهای فنوتایپی جهت شناسایی سویه های مولد بیوفیلم است.

**واژگان کلیدی:** استافیلوکوکوس اورئوس، عفونت ادراری، بیوفیلم، ژلوز قرمز کنگو، میکروتیتر پلیت، لوکوس *ica*

### مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از بیماری زاهاى فرصت طلب است که می تواند سبب بروز بیماریهای خفیف و همچنین شدید در انسان گردد. این باکتری یکی از علل مهم عفونتهای مرتبط با دستگاههای پزشکی مانند سوندهای ادراری، کاتترهای عروقی و پروتز محسوب می شود. توانایی تشکیل بیوفیلم توسط استافیلوکوکوس اورئوس بر روی این دستگاهها می تواند منجر به عفونتهای مقاوم نسبت به درمانهای آنتی بیوتیکی گردد(۱). از جمله این عفونتها می

توان به عفونتهای دستگاه ادراری اشاره کرد که از جمله رایجترین عفونتهای باکتریایی به شمار می روند و سالانه ۱۵۰ میلیون نفر را در سراسر جهان مبتلا می کنند(۲). عفونتهای دستگاه ادراری به دو دسته پیچیده و غیر پیچیده طبقه بندی می شوند. نوع غیر پیچیده (بدون عوارض)، افراد سالم (کسانی که هیچگونه اختلال ساختاری یا عصبی در مجاری ادراری ندارند) را درگیر می کند. این عفونتها به التهاب مثانه و التهاب کلیه تقسیم می شوند. نوع پیچیده مرتبط با عواملی است که مجاری ادراری و یا دفاع میزبان را

جمله این پروتئینها می توان به Cna, FnbB, FnbA, Eno, EbpS, Fib و Bap اشاره کرد. این پروتئینها توانایی بالایی برای اتصال به ماتریکس پروتئینی خارج سلولی میزبان دارند. لازم به ذکر است که در مرحله تجمع، سنتز عوامل چسبنده پلی ساکاریدی بین سلولی (PIA) بسیار حائز اهمیت است (۹، ۱۰). هر چند که برخی از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس قادر به تشکیل بیوفیلیم به شکل مستقل از PIA هستند، اما در هر صورت PIA برای تجمع باکتریها طی تشکیل بیوفیلیم ضروری است. محصول ژن icaADBC است و سبب اتصال سلولها به یکدیگر می شود (۱۱). لوکوس ژنی ica رمزکننده پروتئینهایی است که سبب سنتز PIA می شوند. در میان این لوکوس، ژنهای icaA و icaD نقش مهمتری در تشکیل بیوفیلیم در استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ایفا می کنند (۱۲).

این مطالعه با هدف بررسی فنوتایپی و ژنوتایپی تشکیل بیوفیلیم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در سال ۱۳۹۵ در شهر اصفهان انجام گرفته است.

### روش کار

در طی خرداد ماه تا دی ماه سال ۱۳۹۵ در مجموع ۹۶ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری از آزمایشگاه یک بیمارستان مرجع در شهر اصفهان جمع آوری شدند. جدایه ها پس از انتقال به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه اصفهان، بر روی محیط ژلوز مغذی (Biolife, Italy) کشت داده شدند و به منظور شناسایی و تأیید جدایه ها که در آزمایشگاه بیمارستان به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد شناسایی قرار گرفته بودند، از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی nuca استفاده گردید (۱۳). جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شده جهت انجام بررسیهای بیشتر در ویالهای کرایو واجد محیط مغذی و گلیسرول در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. به منظور بررسی توانایی تشکیل بیوفیلیم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس به روش کیفی از آزمون ژلوز قرمز کنگو استفاده شد. برای این منظور، باکتریها بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو کشت داده شدند و سپس پلیتها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در گرمخانه گذاشته

تحت تأثیر قرار می دهند. این عوامل شامل انسداد مجاری ادراری، احتباس ادرار ناشی از بیماریهای عصبی، سرکوب سیستم ایمنی، نارسایی کلیه، پیوند کلیه، بارداری و حضور اجسام خارجی مانند سوند می باشد (۳).

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس اغلب به عنوان مهمترین عوامل ایجاد بیوفیلیم در بیماران مبتلا به عفونت ادراری حائز اهمیت هستند (۴، ۵). استافیلوکوکوس اورئوس یکی از علل نسبتاً غیررایج عفونتهای دستگاه ادراری محسوب می شود. جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از نمونه های ادراری اغلب ناشی از باکتری می استافیلوکوکوس است که در سایر قسمتها رخ داده است. استفاده از ابزارهای خارجی در دستگاه ادراری از قبیل سوندهای ادراری دائمی، خطر حضور استافیلوکوکوس اورئوس را در دستگاه ادراری افزایش می دهد (۶).

واژه بیوفیلیم به طور رسمی در سال ۱۹۷۸ میلادی جهت توصیف جمعیتی سازمان یافته از سلولهای باکتریایی که به یک سطح زنده یا غیر زنده متصل هستند و درون ماتریکس پلیمری خود ساخته، محصور شده اند مورد استفاده قرار گرفت (۷). مراحل تشکیل بیوفیلیم در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را به طور کلی می توان به ۳ مرحله اتصال، بلوغ و انتشار تقسیم بندی کرد. ابتدا سلول پلانکتونیک به صورت برگشت پذیر با سطح ارتباط برقرار کرده و در صورت جدا نشدن به صورت برگشت ناپذیر به سطح متصل می شود. اتصال اولیه از طریق پروتئینهای سطحی تحت عنوان اجزای سطحی میکروبی شناسایی کننده مولکولهای چسبنده (MSCRAMM) صورت می گیرد. این پروتئینها در طول عفونت نقش عمده ای در اتصال به فاکتورهای میزبان مانند فیبرینوژن، فیبرونکتین، کلاژن و ... ایفا می کنند. تولید ماتریکس پلیمری خارج سلولی و تقسیم سلولها منجر به تشکیل میکروکلنی می شود و ادامه یافتن این مراحل منجر به تشکیل بیوفیلیم بالغ می گردد. ترکیب ماتریکس خارج سلولی، در میان گونه های مختلف متفاوت است اما به صورت عمده شامل پلی ساکاریدها، پروتئینها، DNA خارجی، پروتئینهای حاصل از تخریب فاکتورهای میزبان و ... است (۷، ۸).

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مرحله اتصال از پروتئینهای خانواده MSCRAMMs استفاده می کند. از

این آزمون از جفت پرایمرهای طراحی شده و برنامه ارائه شده توسط Zouharova و همکاران استفاده گردید (۱۶). پس از بررسی فنوتایپی تشکیل بیوفیلیم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس، به منظور تعیین وجود ژنهای icaA و icaD از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، مخلوط واکنش و چرخه حرارتی مطابق با دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده شد (۱۴). جهت بررسی حضور ژنهای cna، fnbA و clfA از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، مخلوط واکنش و چرخه حرارتی منطبق بر پروتکل منتشر شده توسط قاسمیان و همکاران استفاده گردید (۱۷).

#### یافته ها

در این مطالعه جهت شناسایی ۹۶ جدایه که در آزمایشگاه بیمارستان مورد نظر به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس تشخیص داده شده بودند از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی nuca استفاده گردید. با آزمون PCR مشخص شد که تمامی ۹۶ جدایه مورد بررسی که از بیماران مبتلا به عفونت ادراری جدا شده بودند، سویه های استافیلوکوکوس اورئوس هستند. براساس نتایج حاصل از آزمون ژلوز قرمز کنگو، از مجموع ۹۶ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی در این مطالعه، ۵ سویه (۵ درصد) واجد کلنیهای سیاه رنگ (سویه های مولد اسلایم و بیوفیلیم مثبت)، ۶۹ سویه (۷۲ درصد) واجد کلنیهای قرمز تیره (سویه های اسلایم کاذب و بیوفیلیم مشکوک) و ۲۲ سویه (۲۳ درصد) واجد کلنیهای قرمز روشن (سویه های اسلایم منفی و بیوفیلیم منفی) بودند (شکل ۱).

شدند و در ادامه به مدت ۴۸ ساعت نیز در دمای اتاق قرار داده شدند. کلنیهای سیاه رنگ به عنوان سویه های بیوفیلیم مثبت، کلنیهای قرمز رنگ به عنوان سویه های بیوفیلیم منفی و کلنیهای قرمز تیره به عنوان سویه های مشکوک در نظر گرفته شدند. جهت ساخت محیط ژلوز قرمز کنگو از دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده شد (۱۴).

به منظور بررسی توانایی تشکیل بیوفیلیم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس به روش کمی مطابق با دستورالعمل رحیمی و همکاران باکتریها در محیط Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, Germany) حاوی ۰/۲۵٪ گلوکز کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در گرم خانه گذاشته شدند (۱۴). سپس غلظت  $10^6$  CFU/ml از کشت هر سویه تهیه گردید و ۲۰۰ میکرولیتر از هر باکتری به صورت سه تایی درون میکروپلیت (Greiner, Louis, MO, USA) تقسیم شد و پلیتهای واجد کشت باکتریها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در گرم خانه گذاشته شدند. همچنین، از محیط فاقد باکتری به عنوان شاهد استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت، چاهکها شستشو داده شدند و پس از رنگ آمیزی با کریستال ویوله ۰/۳٪ (Sigma, Germany) جذب نوری آنها در طول موج ۵۷۰ nm با خوانشگر الایزا (Stat Fax 2100, USA) خوانده شد. سویه هایی که جذب بالای ۱ داشتند به عنوان بیوفیلیم قوی، سویه هایی که جذب بین ۰/۲ تا ۱ داشتند به عنوان بیوفیلیم متوسط یا نسبی، سویه هایی با جذب کمتر از ۰/۲ به عنوان بیوفیلیم ضعیف و اگر جذب کمتر از کنترل بود به عنوان سویه های بیوفیلیم منفی در نظر گرفته شدند.

به منظور استخراج DNA، از روش جوشاندن استفاده شد. مطابق با دستورالعمل رحیمی و همکاران (۱۵) ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، در میکروتیوبهای استریل اضافه شد. سپس چند کلنی از کشت تازه باکتری به آب مقطر استریل اضافه و به خوبی ورتکس گردید. میکروتیوبهای حاوی باکتری به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شده و پس از آن، به مدت ۱۵ دقیقه در  $12000 \times g$  سانتریفیوژ شدند و ۱۰ میکرولیتر از محلول رویی موجود در میکروتیوب، به عنوان DNA الگو در فرآیند PCR استفاده شد.

شناسایی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس به کمک آزمون PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی nuc که رمزکننده آنزیم ترمونوکلئاز است، انجام شد. جهت انجام



جدول ۱- فراوانی و درصد ژنهای مختلف مورد بررسی در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس

ژن	بیوفیلم مثبت (۶۹ سویه)		بیوفیلم منفی (۲۷ سویه)		تمامی سویه ها (۹۶ سویه)	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
<i>icaA</i>	۵۸	۸۴	۲۳	۸۵	۸۱	۸۴
<i>icaD</i>	۵۹	۸۶	۲۱	۷۸	۸۰	۸۳
<i>cna</i>	۳۰	۴۳	۱۱	۴۱	۴۱	۴۳
<i>fnbA</i>	۴۲	۶۱	۱۷	۶۳	۵۹	۶۱
<i>clfA</i>	۵۲	۷۵	۱۷	۶۳	۶۹	۷۲

## بحث

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت ادراری بسیار حائز اهمیت است چرا که فرایند درمان را تحت تأثیر قرار می دهد. تشکیل بیوفیلم از طرفی سبب کاهش امکان نفوذ آنتی بیوتیکها و طبیعتاً کاهش تأثیر آنها بر روی باکتری می گردد و همچنین تغییر باکتریها در ساختار بیوفیلم به گونه ای است که تأثیر مواد ضد باکتریایی را کاهش می دهد. از این رو تعیین توانایی تشکیل بیوفیلم در تجویز دارو و آگاهی از وضعیت بهداشتی حال حاضر بسیار مؤثر است. تاکنون روشهای مختلفی جهت بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم مورد استفاده قرار گرفته است و نتایج متفاوتی نیز حاصل شده است. در مطالعه حاضر، به منظور تعیین سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مولد بیوفیلم از ترکیبی از روشهای فنوتایپی و ژنوتایپی استفاده گردید.

در مطالعه رحیمی و همکاران، در سال ۲۰۱۶ که بر روی سویه های جدا شده از عفونت ادراری در طی ۳ سال در شهر تهران انجام گرفت، ۹۴ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین به کمک آزمون ژلوز قرمز کنگو، بیوفیلم مثبت گزارش شدند. همچنین، با استفاده از روش میکروتیتراپلیت، ۱۵ درصد سویه ها بیوفیلم قوی، ۶۲ درصد بیوفیلم متوسط و ۲۳ درصد بیوفیلم ضعیف و منفی بودند (۱۴). در مطالعه یوسفی و همکاران در سال ۲۰۱۶، فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس بیوفیلم مثبت جدا شده از عفونت ادراری ۶۹/۲ درصد بود (۱۸). در مطالعه Ando و همکاران، در سال ۲۰۰۴ که بر روی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از افراد مبتلا به عفونت ادراری انجام گرفت، ۹/۲ درصد بیوفیلم قوی و ۲۸/۴ درصد بیوفیلم متوسط بودند (۱۹). Khan و همکاران در سال ۲۰۱۱، فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مولد بیوفیلم قوی، متوسط و منفی را به ترتیب ۱۴/۵۱ درصد، ۵۰/۳۸ درصد و ۳۵/۱۱ درصد گزارش دادند (۲۰). در مطالعه صبا و همکاران در سال ۲۰۱۸، ۴۳ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه با استفاده از آزمون ژلوز

قرمز کنگو بیوفیلم مثبت بودند و با روش میکروتیتراپلیت ۹۲ درصد سویه ها به عنوان بیوفیلم مثبت گزارش شدند (۲۱). در مطالعه رحیمی و همکاران در سال ۲۰۱۶، ۸۲ درصد سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در آزمون ژلوز قرمز کنگو واجد کلنیهای سیاه رنگ بودند و در آزمون میکروتیتراپلیت نیز ۶۸ درصد به عنوان سویه های بیوفیلم مثبت معرفی شدند (۲۲). در مطالعه دیگری، رحیمی فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مولد بیوفیلم در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری در سال ۲۰۱۸ را ۸۹ درصد گزارش نمود (۲۳). در سال ۲۰۱۵ در مطالعه ای که توسط رحیمی بر روی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از افراد سالم در شهر تهران به انجام رسید، فراوانی سویه های مولد بیوفیلم به روش آزمون ژلوز قرمز کنگو، ۶۷ درصد گزارش گردید (۱۷). تفاوت میان فراوانی سویه های مولد بیوفیلم در مطالعات مختلف می تواند ناشی از نوع نمونه های مورد بررسی و همچنین تفاوت در روشهای مورد استفاده در مطالعات مختلف باشد. بر اساس مطالعات انجام شده پیشین و همچنین مطالعه حاضر می توان گفت که روش ژلوز قرمز کنگو نسبت به روش میکروتیتراپلیت از حساسیت و دقت کمتری برخوردار است. در واقع می توان از روش کیفی ژلوز قرمز کنگو جهت غربالگری استفاده کرد و از آزمون تأییدی میکروتیتراپلیت جهت تعیین توانایی تشکیل بیوفیلم استفاده کرد. بررسی ژنهای درگیر در فرآیند تشکیل بیوفیلم بسیار حائز اهمیت است چرا که می تواند در یافتن راهکاری جهت درمان عفونتهای ناشی از باکتریهای بیوفیلم مثبت مؤثر باشد. در واقع آگاهی از ژنهای مؤثر در فرآیند تشکیل بیوفیلم با جلوگیری یا محدود کردن بیان آنها و یا غیرفعال کردن محصولات آنها می تواند مانع از تشکیل بیوفیلم شده و سبب افزایش اثر آنتی بیوتیکها و ترکیبات ضدباکتریایی بر عفونتهای ناشی از باکتریهای بیوفیلم مثبت گردد. در مطالعات مختلف در ایران و سایر کشورها حضور ژنهای مؤثر بر تشکیل بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفته است.

های مختلف بسیار نزدیک است چرا که هر دو ژن در سنتز PIA نقش دارند و این موضوع نیز بر نقش لوکوس ژنی *ica* در سنتز بیوفیلیم تأکید می‌کند. هر چند در بیشتر مطالعات انجام گرفته، سویه های بیوفیلیم مثبت واجد ژنهای *icaA* و *icaD* بودند. در مطالعه حاضر درصد بالایی از سویه های بیوفیلیم مثبت واجد این دو ژن بودند، اما عدم حضور این ژنها در میان برخی از سویه های بیوفیلیم مثبت نیز مشاهده گردید که می تواند ناشی از این امر باشد که برخی از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس قادر به تشکیل بیوفیلیم به صورت مستقل از سنتز PIA هستند. در سایر مطالعات نیز به این موضوع اشاره شده است (۲۱، ۲۷، ۲۸). علاوه بر لوکوس ژنی *ica* که در سنتز PIA نقش دارند، ژنهای دیگری نیز در تشکیل بیوفیلیم موثر می باشند که از آن جمله می توان به ژنهای رمزکننده پروتئینهای مؤثر در اتصال باکتریها به یکدیگر و یا به پروتئینهای میزبان و یا در اتصال به سطوح غیرزنده اشاره کرد. در مطالعه یوسفی و همکاران در سال ۲۰۱۶، تمامی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس واجد ژنهای *clfA* و *fnbA* بودند اما هیچکدام واجد ژن *bap* نبودند (۱۸). در مطالعه قاسمیان و همکاران در سال ۲۰۱۴، ۱۰۰ درصد سویه های مورد مطالعه واجد ژن *clfA*، ۶۷ درصد واجد ژن *fnbA*، ۵۶ درصد سویه واجد ژن *fnbB* و ۷۸ درصد نیز واجد ژن *cna* بودند؛ اما تمامی سویه ها فاقد ژن *bbp* بودند (۲۹). در مطالعه Ando و همکاران در سال ۲۰۰۴، ۷۲/۵ درصد سویه های جدا شده از عفونت ادراری واجد ژن *fnbA* و ۷۷ درصد نیز واجد ژن *clfA* بودند (۱۹). در مطالعه Kawamura و همکاران در سال ۲۰۱۱، تمامی سویه ها از نظر ژنهای *fnbA*، *fnbB* و *clfA* مثبت بودند. همچنین، تنها ۱/۱ درصد سویه ها واجد ژن *bbp* و ۱۹/۸ درصد نیز واجد ژن *cna* بودند (۳۰). در مطالعه Vergara و همکاران در سال ۲۰۱۷، تمامی سویه ها حامل ژنهای *agr* و *fnbA* بودند و هیچکدام از سویه های مورد بررسی از نظر ژن *fnbB* مثبت نبودند. علاوه بر این، ۸۱/۸ درصد و ۹۵/۵ درصد سویه ها به ترتیب واجد ژنهای *cna* و *clfA* بودند (۲۶).

رضایی و همکاران در مطالعه ای در سال ۲۰۱۶ فراوانی ژنهای *icaA* و *icaD* را به ترتیب ۳۰ درصد و ۲۰ درصد و فراوانی سویه های واجد هر دو ژن را ۱۲/۵ درصد گزارش کردند (۲۴). در مطالعه میرزایی و همکاران در سال ۲۰۱۴، ۸۰/۶ درصد، ۵۱/۶ درصد، ۴۵/۱ درصد و ۷۷/۴ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب واجد ژنهای *icaA*، *icaD*، *icaB* و *icaC* بودند (۲۵). در مطالعه یوسفی و همکاران در سال ۲۰۱۶، تمامی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی واجد ژن *icaA* بودند (۱۸). در مطالعه رحیمی و همکاران در سال ۲۰۱۶، تمامی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلیم واجد هر دو ژن *icaA* و *icaD* بودند (۱۴). در مطالعه دیگری توسط رحیمی و همکاران، فراوانی ژنهای *icaA*، *icaB*، *icaC* و *icaD* در میان سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به ترتیب ۱۰۰، ۹۳، ۸۳ و ۱۰۰ درصد تعیین گردید (۲۲). رحیمی در سال ۲۰۱۵ فراوانی ژنهای *icaA*، *icaB* و *icaD* را در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از افراد سالم را ۳/۳ درصد گزارش نمود (۵). در مطالعه Gad و همکاران، در سال ۲۰۰۹ تمام سویه های استافیلوکوکوس اورئوس بیوفیلیم مثبت واجد ژنهای *icaA* و *icaD* بودند (۱۲). در مطالعه Ando و همکاران در سال ۲۰۰۴، ۹۹ درصد سویه ها واجد ژن *icaA* بودند (۱۹). در مطالعه Vergara و همکاران در سال ۲۰۱۷، تمامی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس واجد ژنهای *icaA* و *icaD* بودند (۲۶). در مطالعه صبا و همکاران در سال ۲۰۱۸، ۵۲ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی واجد هر دو ژن *icaA* و *icaD* بودند. همچنین، در آن مطالعه سویه های فاقد لوکوس ژنی *ica* نیز قادر به تشکیل بیوفیلیم بودند و عدم حضور این لوکوس ژنی به معنای عدم توانایی تشکیل بیوفیلیم نبود (۲۱). نتایج حاصل از این مطالعه و نتایج مطالعات قبلی نشان دهنده اهمیت لوکوس ژن *ica* در فرآیند تشکیل بیوفیلیم است چرا که عمده سویه های بیوفیلیم مثبت قادر به بیان این لوکوس ژنی هستند. از طرف دیگر، میزان بیان این دو ژن در سویه

این مطالعه و مطالعات قبلی *icaA*، *icaD*، *clfA*، *fnbA* و *cna* به ترتیب فراوانترین ژنها در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس بیوفیلیم مثبت هستند که در اتصال باکتریها به یکدیگر و یا به سطوح بسیار موثر هستند.

#### نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده شیوع بالای سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مولد بیوفیلیم در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری در بیمارستان مورد مطالعه است. همچنین، با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می توان اعلام کرد که حضور ژنهای مربوط به ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و همچنین ترکیبات مؤثر در فرآیند چسبندگی در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس، میزان تشکیل بیوفیلیم را افزایش می دهد. هرچند که حضور مطلق این ژنها نیز به معنای تشکیل بیوفیلیم نیست و تنها احتمال تشکیل بیوفیلیم در میان سویه ها را افزایش می دهد.

#### تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان به انجام رسیده است.

طبق نتایج حاصل از این مطالعه و همچنین مطالعات قبلی انجام شده نقش ژنهایی مانند *icaA* و *icaD* در تشکیل بیوفیلیم بسیار حائز اهمیت است. در برخی از مطالعات به تأثیر مثبت این ژنها بر فرآیند تشکیل بیوفیلیم اشاره شده است. Ando و همکاران به مقایسه سویه های فاقد و دارای این ژنها و بررسی توانایی تشکیل بیوفیلیم در بین آنها پرداخته و متوجه شدند حضور این ژنها توانایی تشکیل بیوفیلیم را در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس افزایش می دهد، هرچند که فقدان این ژنها به معنای عدم توانایی تشکیل بیوفیلیم توسط باکتری نمی باشد (۱۹). علاوه بر این، شرایط فیزیولوژیک مختلف نیز می توانند تشکیل بیوفیلیم را تحت تأثیر قرار دهند. بسته به شرایط فیزیولوژیک مختلف و شرایطی که تحت آن شرایط بیوفیلیم شکل می گیرد اهمیت ژنهای ذکر شده متفاوت خواهد بود (۷). نکته بسیار بارز اهمیت لوکوس ژنی *ica* است که محصولات آن در سنتز PIA نقش دارند. PIA در فرآیند تشکیل بیوفیلیم بسیار مؤثر است و بیشتر سویه های استافیلوکوکوس اورئوس بیوفیلیم مثبت، بیوفیلیم وابسته به PIA تشکیل می دهند. در مجموع بر اساس نتایج حاصل از

## REFERENCES

---

- 1- Herman-Bausier P, El-Kirat-Chatel S, Foster TJ, Geoghegan JA, Dufrêne YF. *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A mediates cell-cell adhesion through low-affinity homophilic bonds. *MBio*. 2015;6(3):e00413-15.
- 2- 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.
- 3- Fihn SD. Acute uncomplicated urinary tract infection in women. *New England Journal of Medicine*. 2003; 349:259-266.
- 4- Petrelli D, Repetto A, D'ercole S, Rombini S, Ripa S, Prena M, et al. Analysis of methicillin-susceptible and methicillin-resistant biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from catheter infections isolated in a large Italian hospital. *Journal of Medical Microbiology*. 2008;57(3):364-72.
- 5- Rahimi F. Biofilm production among *Staphylococcus aureus* strains isolated from healthy people. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine* 2015;20(68):21-9.
- 6- Muder RR, Brennen C, Rihs JD, Wagener MM, Obman A, Obman A, et al. Isolation of *Staphylococcus aureus* from the urinary tract: association of isolation with symptomatic urinary tract infection and subsequent staphylococcal bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*. 2006;42(1):46-50.
- 7- Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*. 2015;7(4):493-512.
- 8- Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*. 2011;2(5):445-59.
- 9- Gowrishankar S, Kamaladevi A, Balamurugan K, Pandian SK. In vitro and in vivo biofilm characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from patients associated with pharyngitis infection. *BioMed Research International*. 2016;2016:1-15.
- 10- Khoramian B, Jabalameli F, Niasari-Naslaji A, Taherikalani M, Emaneini M. Comparison of virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections. *Microbial Pathogenesis*. 2015;88:73-7.



- 11- Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2015;10(5):7.
- 12- 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. *Journal of Infection in Developing Countries*. 2009;3(05):342-51.
- 13- Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characteristics of hospital-and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Journal of Medical Microbiology*. 2014;63(6):796-804.
- 14- 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.
- 15- 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.
- 16- 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.
- 17- 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.
- 18- 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.
- 19- Ando E, Monden K, Mitsuata R, Kariyama R, Kumon H. Biofilm formation among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with urinary tract infection. *Acta Medica Okayama*. 2004;58(4):207-14.
- 20- Khan F, Shukla I, Rizvi M, Mansoor T, Sharma S. Detection of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Does it have a role in treatment of MRSA infections. *Trends in Medical Research*. 2011;6(2):116-23.
- 21- Saba T, Sajid M, Khan AA, Zahra R. Role of intracellular adhesion *icaAD* and *agr* genes in biofilm formation in clinical *S. aureus* isolates and assessment of two phenotypic methods. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 2018;34(3):633-7.
- 22- 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.

- 23- 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.
- 24- Rezaei M, Moniri R, Mousavi SGA, Shiade MJ. Prevalence of biofilm formation among methicillin resistance *Staphylococcus aureus* isolated from nasal carriers. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013;6(6):e9601.
- 25- Mirzaee M, Najar-Peerayeh S, Behmanesh M, Forouzandeh-Moghadam M, Ghasemian A-M. Detection of intracellular adhesion (*ica*) gene and biofilm formation *Staphylococcus aureus* isolates from clinical blood cultures. Journal of Medical Bacteriology. 2014;3(1-2):1-7.
- 26- Vergara A, Normanno G, Di Ciccio P, Pedonese F, Nuvoloni R, Parisi A, et al. Biofilm formation and its relationship with the molecular characteristics of food-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Journal of Food Science. 2017;82(10):2364-70.
- 27- O'Gara JP. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiology Letters. 2007;270(2):179-88.
- 28- Joo H-S, Otto M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. Chemistry and Biology. 2012;19(12):1503-13.
- 29- Ghasemian A, Najar Peerayeh S, Bakhshi B, Mirzaee M. Several virulence factors of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients in Tehran. International Journal of Enteric Pathogens. 2015;3(2):1-6.
- 30- Kawamura H, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Miyanojara H, Hashiguchi T, et al. Quantitative analysis of biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains from patients with orthopaedic device-related infections. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2011;63(1):10-5.