فراوانی *agr* تایپها و مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد بیوفیلم جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در اصفهان در سال ۱۳۹۶

نرگس سادات مصطفوی[۱]، فاتح رحیمی[۲*]

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی-میکروبهای بیماریزا، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۲- دکتری تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
*نشانی برای مکاتبه: f.rahimi@sci.ui.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از شایعترین عوامل بیماریزای بیمارستانی به شمار می رود که می تواند باعث ایجاد طیف وسیعی از عفونتها مانند عفونت ادراری شود. این باکتری قادر به تشکیل بیوفیلم می باشد که منجر به بروز عفونتهای عودشونده و مزمن می شود. *استافیلوکوکوس اورئوس* از توانایی بالایی جهت کسب مقاومت نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیکها مانند متی سیلین، ونکومایسین، آمینوگلیکوزیدها و ... برخوردار می باشد که این امر منجر به ظهور سویه های مقاوم به چند دارو می شود و درمان عفونتهای حاصل از این باکتریها را با سختی مواجه می کند. هدف این مطالعه تعیین فراوانی *agr* تایپهای مختلف و مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد بیوفیلم جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در اصفهان بود.

مواد و روشها: در طی سال ۱۳۹۶، در مجموع ۱۱۹ سویه مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری از آزمایشگاه یک بیمارستان مرجع در اصفهان جمع آوری و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *nuc*A مورد تأیید قرار گرفتند. جهت بررسی توانایی تولید بیوفیلم سویه ها از آزمونهای کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت استفاده گردید و مقاومت سویه های مولد بیوفیلم نسبت به ۸ آنتی بیوتیک مختلف به روش انتشار دیسک و بر اساس دستورالعملهای CLSI تعیین گردید. حضور ژنهای مختلف مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها و همچنین *agr* تایپهای مختلف در میان سویه ها به ترتیب با استفاده از آزمونهای PCR جداگانه و multiplex-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: تمامی ۱۱۹ سویه جداسازی شده به عنوان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد تأیید قرار گرفتند و با استفاده از آزمونهای کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت، ۷۸ سویه (۶۶ درصد) قادر به تولید بیوفیلم قوی و متوسط بودند که در این میان ۱۲ درصد سویه ها به عنوان مولد اسلایم شناسایی شدند. نتایج حاصل از آزمون تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد که ۴۳، ۳۵، ۳۶، ۷۳، ۳۲، ۴۱، ۴۶ و ۴۳ درصد سویه ها به ترتیب نسبت به سفوکسی تین، جنتامایسین، کانامایسین، استرپتومایسین، آمیکاسین، توبرامایسین، آزیترومایسین و اریترومایسین مقاوم بودند. علاوه بر این، ۴۴، ۳۲ و ۱۷ درصد سویه ها به ترتیب واجد ژنهای *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*، *ant(6)-Ia* و *aph(3')-IIIa* بودند. از طرف دیگر، ۴۰ درصد سویه های مولد بیوفیلم واجد لوکوس *agr* نبودند و *agr* تایپ I فراوانترین تایپ در میان سویه ها بود.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر مؤید شیوع بالای سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد بیوفیلم و مقاوم به آنتی بیوتیک در میان بیماران در بیمارستان مورد مطالعه در اصفهان می باشد که انتشار این سویه ها تهدید بزرگی برای سلامت جامعه محسوب می شود.

واژگان کلیدی: ***استافیلوکوکوس اورئوس*، عفونت ادراری، بیوفیلم، آمینوگلیکوزید، *agr* تایپینگ**

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری گرم مثبت است که به عنوان نرمال بایوتا پوست و غشاهای مخاطی در بینی و بخش فوقانی دستگاه تنفس در انسان و گونه های مختلف جانوری حضور دارد. این میکروارگانیسم یک باکتری بیماریزای همزیست با انسان است که تقریباً ۳۰ درصد از جمعیت جهان توسط این باکتری کلونیزه می شوند. این باکتری مهمترین باکتری بیماریزای بیمارستانی است که قابلیت ایجاد طیف وسیعی از عفونتها از جمله عفونتهای پوست و بافتهای نرم، ذات الریه، عفونت استخوان، التهاب درون شامه قلب، گندخونی و عفونتهای مرتبط با ابزارهای خارجی نظیر شانت، سوند و ونتیالتورهای مکانیکی را دارد (۱, ۲). استافیلوکوکوس اورئوس از جمله عوامل بیماریزایی است که می تواند به دستگاه ادراری حمله کند و باعث ایجاد عفونت شود. اگرچه این باکتری به عنوان مسئول ایجاد ۰/۵ تا ۶ درصد از عفونتهای ادراری شناخته می شود، اما در صورت عدم درمان صحیح و مناسب به یک عفونت عودشونده و تهدید کننده زندگی بیماران تبدیل خواهد شد (۳). همچنین وجود ابزارهای خارجی از جمله سوند، ریسک ابتلا به عفونتهای ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس در دستگاه ادراری را افزایش می دهد (۴). به طورکلی ایجاد عفونت ادراری توسط استافیلوکوکوس اورئوس ناشی از توانایی این باکتری در اتصال به سطوح مختلف و ایجاد جمعیتی از سلولهای باکتریایی پیچیده و سازمان یافته درون ماتریکس پروتئینی یا پلی ساکاریدی به نام بیوفیلم می باشد که به بقاء باکتری و همچنین مقاومت آن در برابر عوامل ضدمیکروبی کمک می کند و باعث ایجاد مشکلات جدی در سلامت انسان می شود (۵).

تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس یک فرآیند پویا و دینامیک و در عین حال پیچیده است و شامل ۴ مرحله اتصال، تشکیل میکروکلنی، بلوغ و پراکندگی است (۶, ۷). بیان بسیاری از عوامل حدت این باکتری توسط سیستم حدنصاب تنظیم کننده ژنهای جانبی (agr) هماهنگ می شود (۸). این سیستم باعث ایجاد تغییرات مشخص در بیان ژن در سطح مشخصی از تراکم سلولی می شود که به این فرآیند سیستم حدنصاب احساس گفته می شود (۹). لوکوس agr از دو واحد رونویسی منشعب شامل RNAII و RNAIII تشکیل شده است که به ترتیب تحت کنترل پروموترهای P2 و P3 قرار دارند (۱۰). اپرون P2 چهار پروتئین AgrA، AgrB، AgrC و AgrD را رمزگذاری می کند و پروموتر P3 در مسیری مخالف مولکول افکتور سیستم agr یعنی RNAIII را رمز می کند. agrD یک پپتید خود القاگر حلقوی (AIP) را رمز می کند که از طریق محصول ژن agrB پردازش و به فضای خارج سلولی ترشح می شود. AIP با ساختار حلقه تیولاکتونیک، در فاز نمایی اولیه، باعث فعال شدن فوری دو پروموتر می شود. هنگامی که تراکم سلولهای باکتریایی به حد مشخصی می رسد، غلظت مشخصی از AIP به گیرنده هیستیدین کیناز (AgrC) متصل می شود که منجر به فعال شدن آن و متعاقباً فسفوریلاسون AgrA (یک تنظیم کننده پاسخ) می گردد. سپس، AgrA فسفوریله شده رونویسی RNAIII را در پروموتر P3 فعال می کند. RNAIII به عنوان یک عامل رونویسی عمل می کند و بیان ژنهای رمز کننده عوامل حدت ترشحی را فعال می نماید. استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس اختصاصیت AIP به گیرنده سیگنال AgrC به چهار نوع agr شامل agrI و agrII و agrIII و agrIV طبقه بندی می گردد (۱۱). همچنین مطالعات مشخص کرده اند که میان نوع agr و بیماری حاصل از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ارتباط مشخصی وجود دارد (۱۲). تشکیل بیوفیلم در این باکتری به گونه ای است که به مقاومت باکتری در برابر عوامل ضدمیکروبی از جمله آنتی بیوتیکها کمک می کند و حذف و ریشه کنی عفونت ادراری ناشی از این باکتریها را با مشکل مواجه می کند (۵).

آنتی بیوتیکهای آمینوگلیکوزیدی (AGs) گروهی از داروها با طیف وسیعی از کاربردهای درمانی هستند (۱۳). این دسته از آنتی بیوتیکها نقش مهمی در درمان عفونتهای استافیلوکوکی ایفا می کنند (۱۴). ساختار آمینوگلیکوزیدها از یک حلقه ۲-دئوکسی استرپتامین (۲-DOS) تشکیل شده است که دو یا تعداد بیشتری قند از طریق پیوندهای گلیکوزیدی به آن متصل شده اند. این ساختار شیمیایی در تمامی اعضای خانواده آمینوگلیکوزیدها مشابه است (۱۵). سازکار اصلی و رایج مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها در گونه های استافیلوکوکی، غیرفعالسازی آنتی بیوتیک توسط آنزیمهای تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها (AME) است که توسط عناصر ژنتیکی رمز می شوند. ژنهای aac(6')-Ie-aph(2'')، ant(4')-Ia و aph(3')-IIIa که به ترتیب آنزیمهای آمینوگلیکوزید-´۶-N-استیل ترانسفراز/"۲-O-فسفوریل ترانسفراز، آمینوگلیکوزید-´۴-O-نوکلئوتیدیل ترانسفراز I و آمینوگلیکوزید-´۳-O- فسفوریل ترانسفراز III را رمز می کنند که از جمله شایعترین ژنهای رمزکننده آنزیمهای تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها می باشند (۱۴, ۱۶). علاوه بر آنزیمهای تغییردهنده، مقاومت می تواند ناشی از پمپ افلاکس، کاهش نفوذپذیری غشاء و جهش یا متیلاسیون محل اتصال آمینوگلیکوزیدها (زیرواحد ۳۰S ریبوزوم)

باشد. همچنین در باکتریهای بیماریزای مولد بیوفیلم، این ساختار یک سازکار کمکی برای مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها محسوب می شود (۱۷). این مطالعه با هدف تعیین فراوانی agr تایپهای مختلف و همچنین مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مولد بیوفیلم جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در شهر اصفهان در طی سال ۱۳۹۶ به انجام رسیده است.

روش کار

جمع آوری جدایه ها

در طی سال ۱۳۹۶، در مجموع ۱۱۹ جدایه مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به یک بیمارستان مرجع در شهر اصفهان جمع آوری شدند. جدایه ها در آزمایشگاه بیمارستان به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد شناسایی قرار گرفته بودند که به صورت هفتگی جمع آوری و به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه اصفهان منتقل شدند. تمامی جدایه ها در ابتدا بر روی محیط کشت ژلوز مغذی (Biolife, Italy) کشت داده شدند و پس از خالص سازی جهت انجام مطالعات بیشتر و انجام مراحل بعدی در لوله های کرایو واجد آبگوشت مغذی (Biolife, Italy) و گلیسرول در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در این مطالعه برای شناسایی و تأیید جدایه هایی که در آزمایشگاه بیمارستان مورد مطالعه به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد شناسایی اولیه قرارگرفته بودند از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن nucA استفاده گردید (۱۸).

بررسی تشکیل بیوفیلم

روش کیفی

جهت بررسی کیفی توانایی باکتریها در تشکیل بیوفیلم از آزمون ژلوز قرمز کنگو بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده گردید (۱۹). برای این منظور، در ابتدا باکتریها به صورت خطی بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو کشت داده شدند و سپس پلیتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شده و در ادامه به مدت ۴۸ ساعت نیز در دمای اتاق قرار داده شدند.

سپس، کلنیهای باکتریایی بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو بر اساس ظهور رنگهای مشکی، قرمز تیره و قرمز روشن به ترتیب به عنوان سویه های بیوفیلم مثبت، بیوفیلم مشکوک و بیوفیلم منفی گزارش شدند

روش کمی

به منظور بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم به روش کمی در میان سویه های استافیلوکوکوس از روش میکروتیتر پلیت مبتنی بر کریستال ویوله بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده شد (۱۹). بر این اساس، تمامی باکتریها در ابتدا در محیط آبگوشت تریپتیک سوی (TSB, Scharlau, Spain) واجد ۰/۲۵ درصد گلوکز کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. در ادامه از نمونه های غنی شده کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه شد و سپس غلظت CFU/ml 10^6 از کشت هر سویه در محیط آبگوشت تریپتیک سوی واجد ۰/۲۵ درصد گلوگز تهیه گردید و ۲۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتری به صورت سه تایی به چاهکهای میکروپلیت ۹۶ خانه ای پلی استرین منتقل و پلیتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. پس از این مدت سه مرتبه شستشوی چاهکها با فسفات بافر سالین انجام گرفت. همچنین از محیط فاقد باکتری به عنوان شاهد استفاده گردید. پس از مرحله شست و شو و حذف باکتریهای غیرچسبنده، چاهکها با استفاده از کریستال ویوله ۰/۳ درصد به مدت ۱۰-۵ دقیقه رنگ آمیزی شده و با آب مقطر شست و شو داده شدند. در نهایت رنگهایی که به بیوفیلم متصل بودند توسط محلول رنگبر اتانول:استون (۲۰:۸۰) حل شدند و جذب نوری هر یک از چاهکها در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه خوانشگر الیزا (Stat Fax 2100, USA) خوانده شد. برای اطمینان از صحت کار، ۳ مرتبه جذب نوری هر یک از نمونه ها بررسی شد. بر این اساس، اگر جذب نوری سویه ها بیشتر از ۱ بود به عنوان بیوفیلم قوی و اگر جذب نوری کمتر از جذب نوری کنترل بود به عنوان بیوفیلم منفی تقسیم بندی شدند. همچنین اگر جذب نوری بین ۰/۲ تا ۱ بود سویه ها به عنوان بیوفیلم متوسط و اگر جذب کمتر از ۰/۲ بود سویه ها به عنوان بیوفیلم ضعیف در نظر گرفته شدند.

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی

در این مطالعه جهت تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی بیوتیکهای سفوکسی تین،

جنتامایسین، کانامایسین، استرپتومایسین، آمیکاسین، توبراماسین، آزیترومایسین و اریترومایسین از روش انتشار دیسک بر اساس تهیه سوسپانسیون تازه باکتریایی و تعیین کدورتی معادل نیم مک فارلند، باکتری با استفاده از سوآپ استریل بر روی محیط ژلوز مولر هینتون (Merck, Germany) به صورت چمنی کشت داده شد. سپس دیسکهای آنتی بیوتیکی (پادتن طب) با کمک پنس استریل در سطح پلیت قرار داده شدند. سرانجام پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، مقاومت یا حساسیت سویه های باکتریایی نسبت به هر آنتی بیوتیک مشخص گردید.

آزمونهای مولکولی

استخراج DNA

جهت استخراج DNA از هر جدایه باکتریایی از کیت استخراج (SinaPure (EX6021شرکت سیناکلون بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید. برای این منظور، در ابتدا یک کلنی از کشت تازه و خالص باکتری در ۱ میکرولیتر محیط آبگوشت لوریا برتانی (Scharlau, Spain) حل شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردید. سپس، میکروتیوبهای واجد محیطهای کشت به مدت ۱۰ دقیقه در g × ۴۵۰۰ سانتریفیوژ شدند و از رسوب باکتریهای شسته شده جهت استخراج DNA بر اساس پروتکل مورد نظر استفاده گردید. همچنین، به منظور بررسی کیفی DNA استخراج شده از ژل آگارز ۰/۷ درصد استفاده شد.

شناسایی جدایه ها

جهت شناسایی نهایی و تأیید تمامی جدایه هایی که در آزمایشگاه بیمارستان به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد شناسایی قرار گرفته بودند از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن nucA (رمزکننده آنزیم ترمونوکلئاز) و بر اساس دستورالعمل و چرخه حرارتی که پیشتر توسط رحیمی و همکاران بهینه سازی شده بود، استفاده گردید (۱۸). توالی پرایمر مورد نظر F: 5´-AGTTCAGCAAATGCATCACA-3 و R:5´-TAGCCAAGCCTTGACGAACT-3 و باند مورد انتظار جهت تکثیر ژن nucA نیز ۴۰۰ جفت باز بود.

تعیین ژنوتایپ مقاومت به آمینوگلیکوزیدها

دستورالعملهای Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) استفاده شد (۲۰). برای این منظور، پس جهت تعیین ژنوتایپ مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها در میان سویه های مقاوم از آزمون PCR با پرایمرهای اختصاصی ژنهای aph(3′)-IIIa و ant(6)-Ia ،aac(6')-Ie-aph(2")-I که

رمزکننده شایعترین آنزیمهای تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی هستند، بر اساس دستورالعمل پیشین Liu و همکاران استفاده گردید (۲۱). اندازه باند مورد نظر برای محصولات هر کدام از ژنهای aac(6')-Ie-aph(2")-Ia، ant(6)-Ia و aph(3′)-IIIa به ترتیب ۳۴۸، ۵۷۷ و ۲۹۲ جفت باز بود.

agr تایپینگ سویه ها

به منظور تعیین تایپ agr از آزمون Multiplex-PCR با پرایمرهای اختصاصی برای تایپهای I و II و III و IV مطابق دستورالعمل Melake و همکاران استفاده گردید (۲۲). برنامه دمایی برای تکثیر ژنها بر اساس جدول ۱ صورت پذیرفت. اندازه باند مورد نظر برای محصولات هر کدام از ژنهایagr تایپهای I و II و III و IV به ترتیب ۴۴۱، ۵۷۵، ۳۲۳، ۶۵۹ جفت باز بود.

یافته ها

شناسایی سویه ها

بر اساس نتایج حاصل از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن nucA، تمامی ۱۱۹ جدایه جمع آوری شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری از آزمایشگاه بیمارستان مورد مطالعه در شهر اصفهان در طی سال ۱۳۹۶، به عنوان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مورد شناسایی و تأیید قرار گرفتند و نتایج حاصل از شناسایی با استفاده از آزمون مولکولی تأیید کننده نتایج شناسایی سویه ها با استفاده از آزمونهای معمول بیوشیمیایی در آزمایشگاه بیمارستان بود.

توانایی تشکیل بیوفیلم

بر اساس نتایج حاصل از آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو مشخص گردید که از مجموع ۱۱۹ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی در این مطالعه، ۱۴ سویه (۱۲ درصد) واجد کلنیهای مشکی رنگ بودند که به عنوان سویه های مولد اسلایم و بیوفیلم مثبت

انتخاب گردیدند. همچنین ۳۲ سویه (۲۷ درصد) واجد کلنیهای قرمز تیره بودند که به عنوان سویه های اسلایم کاذب و بیوفیلم مشکوک شناسایی شدند. علاوه بر این، ۷۳ سویه (۶۱ درصد) نیز واجد کلنیهای قرمز روشن بودند و به عنوان سویه های اسلایم منفی و بیوفیلم منفی دسته بندی شدند.

همچنین نتایج حاصل از آزمون کمی میکروتیتر پلیت نشان داد (شکل ۱) که در مجموع از میان ۱۱۹ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی، ۱۰ سویه (۹ درصد) مولد بیوفیلم قوی (جذب نوری بالای ۱) و ۶۸ سویه (۵۷ درصد) مولد بیوفیلم متوسط (جذب نوری بین ۰/۲ تا ۱) بودند. همچنین، ۴۱ سویه (۳۴ درصد) قادر به تشکیل بیوفیلم نبودند (جذب نوری کمتر از کنترل) که به عنوان سویه های بیوفیلم منفی انتخاب شدند و هیچکدام از سویه ها نیز بیوفیلم ضعیف تشکیل ندادند. بنابراین، در مجموع ۷۸ سویه (۶۶ درصد) واجد توانایی تشکیل بیوفیلم بودند که جهت بررسیهای بیشتر انتخاب شدند.

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی

نتایج حاصل از آزمون تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوسمولد بیوفیلم در این مطالعه نشان داد (شکل ۲) که از میان ۷۸ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مولد بیوفیلم مورد بررسی، ۲۷ سویه (۳۵ درصد) نسبت به جنتامایسین، ۲۸ سویه (۳۶ درصد) نسبت به کانامایسین، ۵۷ سویه (۷۳ درصد) نسبت به استرپتومایسین، ۲۵ سویه (۳۲ درصد) نسبت به آمیکاسین، ۳۲ سویه (۴۱ درصد) نسبت به توبراماسین، ۳۶ سویه (۴۶ درصد) نسبت به آزیترومایسین و ۳۴ سویه (۴۳ درصد) نسبت به اریترومایسین مقاوم بودند. همچنین، ۴۳ درصد سویه ها نیز نسبت به آنتی بیوتیک سفوکسی تین مقاومت نشان دادند که به عنوان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین انتخاب شدند. علاوه بر این، نتایج آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنهای مربوط به مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای آمینوگلیکوزیدی نشان داد که فراوانی ژنهای aac(6')-Ie- aph(2")-Ia، ant(6)-Ia و aph(3′)-IIIa به ترتیب ۴۴ درصد (۳۵ سویه)، ۳۲ درصد (۲۵ سویه) و ۱۷ درصد (۱۳ سویه) بود.

agr تایپینگ سویه ها

نتایج حاصل از بررسی وجود لوکوس ژنی agr در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که از مجموع ۷۸ سویه مورد مطالعه، ۳۱ سویه (۴۰ درصد) فاقد ژنهای مربوط به agr تایپهای I تا IV بودند (شکل ۳). همچنین ۳۵ سویه (۴۵ درصد) واجد تایپ I، ۳ سویه (۴ درصد) واجد تایپ II، ۸ سویه (۱۰ درصد) تایپ III و ۱ سویه (۱ درصد) واجد تایپ IV بودند.

بحث

باکتری استافیلوکوکوس اورئوسیکی از عوامل بیماریزای مهم در ایجاد عفونت ادراری محسوب می شود. از طرفی با توجه به توانایی این باکتری در اتصال به سطوح، امکان تشکیل بیوفیلم فراهم می شود که این امر منجر به بروز مشکلات جدی در درمان عفونت ادراری ناشی از این جدایه ها خواهد شد. باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از توانایی بالایی جهت تشکیل بیوفیلم برخوردار می باشد که منجر به ایجاد عفونتهای مزمن و همچنین ظهور سویه های مقاوم نسبت به آنتی بیوتیکهای مختلف می شود. ظهور سویه های مقاوم با توانایی تشکیل بیوفیلم در محیطهای بیمارستانی می تواند یک خطر جدی برای بیماران محسوب شود؛ به خصوص اگر این بیماران دچار نقص ایمنی بوده و از ابزارهای مصنوعی مانند ونتیلاتور و غیره برای درمان آنها استفاده کنند. این پدیده می تواند

یک تهدید جدی برای بیمارانی باشد که در مراکز بهداشتی و درمانی بستری هستند. به طور کلی مصرف نادرست آنتی بیوتیکها و رعایت نکردن اصول بهداشتی در محیطهای بیمارستانی و در میان کارکنان درمانی از عوامل عمده گسترش این باکتریها در بیمارستانها و مراکز درمانی به شمار می روند. ظهور جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین واجد مقاومت چندگانه که در طی زمان با کسب ژنهای مقاومت ایجاد شده اند و همچنین پیدایش و شیوع جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه، نگرانیهای زیادی را در ارتباط با سلامت و بهداشت جوامع به وجود آورده است. از طرف دیگر، درمان با آنتی بیوتیکهایی نظیر ونکومایسین که به عنوان آخرین سلاح درمانی جهت درمان عفونتهای ناشی از جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مورد استفاده قرار می گیرد نیز بسیار پرهزینه است و دارای عوارض جانبی بیشتری برای بیماران می باشد.

در مطالعه حاضر از ترکیب دو آزمون کمی میکروتیترپلیت و کیفی ژلوز قرمز کنگو جهت بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم در میان سویه

های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در شهر اصفهان استفاده گردید. بر این اساس مشخص گردید که ۱۲ و ۲۷ درصد سویه ها به ترتیب قادر به تشکیل کلنیهای سیاه رنگ و قرمز تیره بودند؛ همچنین، ۹ و ۵۷ درصد سویه ها نیز به ترتیب قادر به تشکیل بیوفیلم قوی و بیوفیلم متوسط بودند. در مطالعه رحیمی و همکاران که در سال ۲۰۱۶ بر روی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جداسازی شده از عفونت ادراری در شهر تهران انجام گرفت، ۹۴ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین با آزمون ژلوز قرمز کنگو مثبت گزارش شدند. همچنین با آزمون میکروتیتر پلیت، ۱۵ درصد سویه ها بیوفیلم قوی و ۶۲ درصد بیوفیلم متوسط تشکیل دادند (۱۹).

خرمیان و همکاران در سال ۲۰۱۵ توانایی تشکیل بیوفیلم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از عفونتهای انسانی در دو بیمارستان در شهر تهران را مورد ارزیابی قرار دادند و نشان دادند که ۵۸ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس با آزمون میکروتیتر پلیت قادر به تشکیل بیوفیلم بودند (۲۳). در مطالعه رضایی و همکاران در سال ۲۰۱۳ که بر روی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جداسازی شده از بینی در شهر کاشان انجام گرفت، در آزمون ژلوز قرمز کنگو ۶۹ درصد سویه ها بیوفیلم مثبت گزارش شدند. همچنین به کمک روش میکروتیتر پلیت، ۱۵، ۱۹ و ۶۵ درصد سویه ها به ترتیب به عنوان سویه های مولد بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف شناسایی شدند (۲۴). در مطالعه نویدی نیا و همکاران در سال ۲۰۲۱ بر روی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از عفونت ادراری در شهر تهران، ۷۰ درصد سویه ها در آزمون میکروتیتر پلیت قادر به تشکیل بیوفیلم بودند (۲۵).

به طور کلی بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه و سایر مطالعات می توان اذعان داشت که روش کمی میکروتیتر پلیت در مقایسه با روش کیفی ژلوز قرمز کنگو از حساسیت و اختصاصیت بیشتری جهت سنجش بیوفیلم برخوردار می باشد. بنابراین، می توان از روش ژلوز قرمز کنگو به عنوان یک روش برای غربالگری استفاده کرد و سپس از آزمون تأییدی میکروتیتر پلیت جهت تعیین سنجش توانایی تشکیل بیوفیلم استفاده نمود.

در مطالعه حاضر هر ۴ agr تایپ در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مولد بیوفیلم شناسایی شدند. بر این اساس مشخص گردید که ۴۵، ۱۰، ۴ و ۱ درصد سویه ها به ترتیب واجد agr تایپهای I، III، II و IV بودند. در مطالعه رحیمی و همکاران در سال ۲۰۱۶، تنها agr تایپهای I، II و III در میان سویه ها شناسایی گردید که در این میان agr تایپ III به عنوان تایپ غالب (۷۸ درصد) در آن مطالعه گزارش شد (۱۹). در مطالعه درخشان و همکاران در سال ۲۰۲۱ نیز ۶۵ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس واجد لوکوس ژنیagr بودند و هر ۴ تایپ نیز مورد شناسایی گرفت. در آن مطالعه agr تایپ III به عنوان تایپ غالب (۴۴/۷ درصد) تعیین گردید (۲۶). Azmi و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان دادند که agr تایپ I فراوانترین تایپ در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در بیماران فلسطینی بود (۲۷). از آنجا که در مطالعه حاضر، ۴۰ درصد از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مولد بیوفیلم (قوی و متوسط) فاقد لوکوس ژنیagr بودند بنابراین می توان اینگونه نتیجه گیری کرد که حضور و یا عدم حضور لوکوس ژنیagr، دلیل قطعی بر توانایی و یا عدم توانایی تشکیل بیوفیلم نیست.

بر اساس نتایج حاصل از آزمون تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی مشخص گردید که ۴۳ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین بودند. تاکنون گزارشات مختلفی در ارتباط با فراوانی سویه های مقاوم به متی سیلین گزارش شده است. در مطالعه رحیمی و همکاران در سال ۲۰۱۳، ۳۰ درصد سویه ها به عنوان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین گزارش شدند (۲۸). در مطالعه دیگری از رحیمی و همکاران در سال ۲۰۱۶، فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین ۲۳/۳ درصد گزارش شد (۲۹). در مطالعه ای دیگر در سال ۲۰۱۶، رحیمی شیوع سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین را ۲۹/۹ درصد گزارش کرد (۱۴). در مطالعه رحیمی و همکاران در سال ۲۰۱۲، شیوع سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین ۱۹/۲ درصد تعیین شد (۳۰).

در مطالعه رحیمی و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در شهر تهران مقاومت نسبتا بالایی نسبت به آنتی بیوتیکهای کانامایسین، توبرامایسین و اریترومایسین مشاهده شد (۳۰). در مطالعه دیگری از رحیمی و همکاران در سال ۲۰۰۹ در شهر تهران، مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای جنتامایسین، کانامایسین و اریترومایسین به ترتیب ۲۰، ۶۶ و ۴۱ درصد گزارش شد (۳۱). در مطالعه دیگری از رحیمی

و همکاران در سال ۲۰۱۶ نیز ۹۹، ۸۲، ۹۹ و ۹۷ درصد سویه ها به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیکهای کانامایسین، آمیکاسین، توبرامایسین و اریترومایسین مقاومت نشان دادند. همچنین در آن مطالعه ۶۵/۶، ۴۷/۸ و ۲۰ درصد سویه ها به ترتیب واجد ژنهای(aac(6')-Ie-aph(2″ ،ant(6)-Ia و aph(3')-IIIa بودند (۱۴). فتح الله زاده و همکاران در سال ۲۰۰۹ در شهر تهران مقاومت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس را نسبت به جنتامایسین ۸۷ درصد و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای کانامایسین، آمیکاسین و توبرامایسین را بیش از ۹۲ درصد گزارش کردند. همچنین ۸۳ و ۷۱ درصد سویه ها واجد ژنهای-aac(6)-Ie aph(2″) و aph(3')-IIIa بودند (۳۲). در مطالعه خسروی و همکاران در سال ۲۰۱۷ نیز ۶۴ و ۴۲ درصد سویه ها به ترتیب واجد ژنهای (aac(6')-Ie-aph(2″ و aph(3')-IIIa بودند (۱۶). به طور کلی دلیل تفاوت در فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و آمینوگلیکوزیدها در گزارشات مختلف را می توان ناشی از تفاوت در سیاستهای کنترل عفونت در بیمارستانهای مختلف، وضعیت فرهنگی و جغرافیایی مختلف در شهرها و استانهای کشور و همچنین میزان و سطح رعایت اصول بهداشتی در نقاط مختلف کشور دانست.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده شیوع نسبتاً بالای سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مولد بیوفیلم مقاوم به آنتی بیوتیکها در بیمارستان مورد مطالعه در شهراصفهان است. ظهور سویه های مولد بیوفیلم و مقاوم به آنتی بیوتیک که برای درمان نیازمند نسلهای جدید آنتی بیوتیک هستند منجر به افزایش دوره درمان و تحمیل هزینه های بالاتر به بیماران خواهد شد. تجویز ناصحیح و فراوان آنتی بیوتیکها، ناکافی بودن دوره درمان و مصرف نادرست آنتی بیوتیکها می تواند از جمله دلایل افزایش میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس چندمقاومتی باشد. بنابراین آگاهی از اصول همه گیرشناسی جمعیتهای میکروبی جهت بررسی انتشار کلونال سویه های با مقاومت چندگانه و همچنین ظهور جدایه های بیماریزا با قابلیت کسب عوامل حدت مختلف در بیمارستانهای مختلف بسیار حائز اهمیت می باشد. در صورت عدم توجه به حذف و ریشه کنی این جدایه ها در محیطهای بیمارستانی، این سویه ها در مدت زمان کوتاهی وارد جامعه می شوند و مبدل به کلون تایپهای غالب در جامعه خواهند شد. به عنوان مثال این باکتریها به راحتی از طریق فاضلاب بیمارستانی وارد محیط شده و می توانند مدتهای مدیدی در آنجا باقی بمانند و به عنوان عامل انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی در میان سایر جنسها و گونه های باکتریایی نقش بسیار مهمی ایفا نمایند. به همین دلیل انجام مطالعات گسترده تر در بیمارستانها در نقاط مختلف کشور جهت دستیابی به اطلاعات کامل و دقیق از پراکندگی و خصوصیات جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک کاملا ضروری به نظر می رسد.

REFERENCE

1. 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. 2016:1-14.
2. TongSY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler Jr VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clinical Microbiology Reviews. 2015;28(3):603-61.

3. 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):485-493.
4. 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.
5. Kiedrowski MR, Horswill AR. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. Annals of the New York Academy of Sciences. 2011;1241(1):104-21.
6. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. Journal of Chinese Medical Association. 2018;81(1):7-11.
7. Dufour D, Leung V, Lévesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. Endodontic Topics. 2010;22(1):2-16.
8. Tsompanidou E, Sibbald MJ, Chlebowicz MA, Dreisbach A, Back JW, van Dijl JM, et al. Requirement of the agr locus for colony spreading of *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology. 2011;193(5):1267-72.
9. Cheung GY, Wang R, Khan BA, Sturdevant DE, Otto M. Role of the accessory gene regulator agr in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. Infection and Immunity. 2011;79(5):1927-35.
10. Azimian A, Najar-Pirayeh S, Mirab-Samiee S, Naderi M. Occurrence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among clinical samples in Tehran-Iran and its correlation with polymorphism of specific accessory gene regulator (AGR) groups. Brazilian Journal of Microbiology. 2012;43(2):779-85.
11. Marques VF, Motta CCd, Soares BdS, Melo DAd, Coelho SdMdO, Coelho IdS, et al. Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. Brazilian Journal of Microbiology. 2017;48:118-24.
12. Bibalan MH, Shakeri F, Javid N, Ghaemi A, Ghaemi EA. Accessory gene regulator types of *Staphylococcus aureus* isolated in Gorgan, North of Iran. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2014;8(4):DC07-DC09.
13. Glinka M, Wojnowski W, Wasik A. Determination of aminoglycoside antibiotics: Current status and future trends. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2020;131:116034.
14. Rahimi F. Characterization of resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2016;9(1):e29237.
15. Garneau-Tsodikova S, Labby KJ .Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. Medchemcomm. 2016;7(1):11-27.
16. Khosravi AD, Jenabi A, Montazeri EA. Distribution of genes encoding resistance to aminoglycoside modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. Kaohsiung Journal of Medical Sciences. 2017;33(12):587-93.

17. Khan F, Pham DTN, Kim Y-M. Alternative strategies for the application of aminoglycoside antibiotics against the biofilm-forming human pathogenic bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. 2020;104(5):1955-76.
18. Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characteristics of hospital-and community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. Journal of Medical Microbiology. 2014;63(6):796-804.
19. 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.
20. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2018.
21. Liu H, Li S, Meng L, Dong L, Zhao S, Lan X, Wang J, Zheng N. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy herds in northern China. Journal of Dairy Science. 2017;100(11):8796-8803.
22. Melake N, Zakaria AS, Ibrahim NH, Salama M, Mahmoud AZ. Prevalence of agr specificity groups among in vitro biofilm forming methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers. International Journal of Microbiology Research. 2014;5:76-84.
23. 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;88:73-77.
24. Rezaei M, Moniri R, Mousavi SGA, Jabari Shiade M. Prevalence of biofilm formation among methicillin resistance *Staphylococcus aureus* isolated from nasal carriers. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013;6(6):e9601.
25. Navidinia M, Mohammadi A, Arjmand R, Dadashi M, Goudarzi M. Molecular typing, biofilm formation, and analysis of adhesion factors in *Staphylococcus aureus* strains isolated from urinary tract infections. Gene Reports. 2021;22:101008.
26. Derakhshan S, Navidinia M, Haghi F. Antibiotic susceptibility of human-associated *Staphylococcus aureus* and its relation to *agr* typing, virulence genes, and biofilm formation. BMC Infectious Diseases. 2021;21(627):1-10.
27. Azmi K, Qrei W, Abdeen Z. Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm production in methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus* isolated from Palestinian patients. BMC Genomics. 2019;20(1):1-12.
28. 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):144-49.
29. Rahimi F, Shokoohizadeh L. Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains among inpatients and outpatients in a referral hospital in Tehran, Iran. Microbial Pathogenesis. 2016;97:89-93.

30. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Prophage and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Iran. Archives of Virology. 2012;157(9):1807-11.
31. Rahimi F, Bouzari M, Maleki Z, Rahimi F. Antibiotic susceptibility pattern among *Staphylococcus* spp. with emphasis on detection of *mec*A gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases. 2009;4(3):143-50.
32. Fatholahzadeh B, Emaneini M, Feizabadi MM, Sedaghat H, Aligholi M, Taherikalani M, et al. Characterization of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from two hospitals in Tehran, Iran. International Journal of Antimicrobial Agents. 2009;33(3):264-65.