فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در اصفهان در سال ۱۴۰۰

فاتح رحیمی[1*]

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

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از جمله باکتریهای بیماریزای اصلی ایجاد عفونتهای مزمن دستگاه ادراری محسوب می شود، که عمدتاً ناشی از توانایی این باکتری در تشکیل بیوفیلم است. مطالعه حاضر، با هدف تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و انتشار کلونال سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در ۲ بیمارستان مختلف در اصفهان به انجام رسید.*

روش کار: *در سال ۱۴۰۰ در مجموع ۱۶۳ ایزوله مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در آزمایشگاه دو بیمارستان در شهر اصفهان جمع آوری شدند و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن nucA و mecA به عنوان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مورد تأیید قرار گرفتند. جهت تعیین توانایی تشکیل بیوفیلم از آزمونهای کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت استفاده گردید و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های مولد بیوفیلم نسبت به ۱۴ آنتی بیوتیک بر اساس استانداردهای CLSI تعیین گردید. جهت تایپینگ سویه ها از روشهای پروفاژ تایپینگ و SCCmec تایپینگ استفاده گردید.*

یافته ها: *در مجموع ۶۱ سویه (۳۷ درصد) مقاوم به سفوکسی تین بودند و در آزمون ژلوز قرمز کنگو ۵۲ سویه (۸۵ درصد) استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین قادر به تشکیل اسلایم بودند. همچنین، ۸۳ درصد از سویه های اسلایم بیوفیلم تشکیل دادند. تمامی سویه ها نسبت به پنی سیلین مقاومت نشان دادند و بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای سیپروفلوکساسین، اریترومایسین، توبرامایسین، کلیندامایسین، تتراسایکلین، آمیکاسین و کانامایسین مشاهده گردید و هیچکدام از سویه ها نسبت به لینزولاید و کینوپریستین-دالفوپریستین مقاوم نبودند. علاوه بر این، دو SCCmec تایپ II (۷ درصد) و III (۹۳ درصد)، ۴ پروفاژتایپ (SGB، SGF، SGFa و SGFb) و دو الگوی پروفاژی در میان سویه ها شناسایی گردید.*

نتیجه گیری: *حضور و دوام گروه های کلونال سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم واجد الگوهای تایپینگ مشابه در میان بیماران در دو بیمارستان مورد مطالعه نشان دهنده منشاء مشترک و انتشار گسترده این سویه ها در اصفهان است.*

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، بیوفیلم، عفونت دستگاه ادراری، ژلوز قرمز کنگو، میکروتیتر پلیت، پروفاژ تایپینگ، SCCmec تایپینگ

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین به عنوان یکی از عوامل اصلی عفونتهای اکتسابی از جامعه و بیمارستان شناخته می شود که می تواند باعث ایجاد عفونتهای خفیف مانند عفونتهای پوست و بافتهای نرم شود. با این حال، این باکتریهای می توانند باعث ایجاد عفونتهای شدیدتر مانند ذات الریه، استئومیلیت، آبسه مغزی، عفونت ادراری و گند خونی شوند که در نهایت منجر به افزایش هزینه های اقتصادی و مرگ بیماران می شوند (۱). از آنجا که *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین یکی از عوامل اصلی ایجاد عفونتهای مزمن در انسان به شمار می رود و عفونتهای ناشی از آن همچنان یک نگرانی عمده در سطح جهان محسوب می شود، این باکتری در سال ۲۰۱۷ توسط سازمان بهداشت جهانی به عنوان یک باکتری بیماریزا با اولویت بالا و بسیار مهم طبقه بندی شد (۲). با توجه به اینکه سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به

متی سیلین مقاومت بالایی نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیکها نشان می دهند و اغلب واجد مقاومتهای چندگانه می باشند، بنابراین اثربخشی آنتی بیوتیکهای معمول بسیار کاهش یافته است و ریشه کن کردن عفونتهای ناشی از این باکتری عملا بسیار دشوار شده است که همین امر باعث افزایش بروز عفونتهای عود شونده می شود (۳, ۴).

استافیلوکوکوس اورئوس از جمله عوامل نسبتا غیررایج ایجاد عفونتهای ادراری در انسان می باشد که چندین دهه است که این باکتری به عنوان شایعترین عامل ایجاد عفونتهای مرتبط با بیوفیلم شناخته شده است (۳). *استافیلوکوکوس اورئوس* قادر به تشکیل به بیوفیلم بر روی سطوح زنده و غیر زنده می باشند که همین امر باعث تشدید عفونتها و افزایش مشکلات درمانی می شود (۵). بیوفیلمها مسئول تقریباً ۸۰ درصد از عفونتهای انسانی محسوب می شوند و یکی از مهمترین ویژگیهای آنها مقاومت سطح بالا در برابر آنتی بیوتیکها، سیستم ایمنی میزبان، ضدعفونی کننده ها و استرس محیطی می باشد (۶). بیوفیلمها معمولاً با وسایل پزشکی مانند سوندهای ادراری، دریچه های مکانیکی قلب، پروتزها و به طور کلی ابزارهای پلاستیکی کار گذاشته شده در بدن مرتبط می باشند، اما می توانند با اندوکاردیت و استئومیلیت نیز مرتبط باشند (۷). در مقایسه با سلولهای پلانکتونیک، بیوفیلمها به دلیل محافظت چند سطحی ناشی از ماتریکس خارج سلولی (که مانع از نفوذ آنتی بیوتیکها می شود)، خصوصیات متابولیکی تغییر یافته و سرعت رشد، از مقاومت بالاتری نسبت به آنتی بیوتیکها برخوردار می باشند (۷). علاوه بر این، توانایی تشکیل بیوفیلم و همچنین ماهیت مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین منجر به شکست درمانهای معمول و عود عفونت می شود (۸). همچنین، نزدیکی سلولهای باکتریایی در بیوفیلم، انتقال افقی ژنها را از طریق کانجوگاسیون تسهیل کرده و منجر به افزایش مقاومت نسبت به عوامل ضدمیکروبی می شود (۹).

متی سیلین یک آنتی بیوتیک نیمه سنتتیک است که اولین بار در سال ۱۹۶۰ جهت درمان عفونتهای ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به پنی سیلین مورد استفاده قرار گرفت و نخستین سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در سال ۱۹۶۱ در انگلستان شناسایی گردید و به سرعت در تمامی کشورهای جهان منتشر شد (۱). مقاومت به متی سیلین ناشی از حضور ژنهای *mec*A و *mec*C می باشد که عضوی از یک عنصر ژنتیکی بزرگ و متحرک می باشند (SCC*mec*). تا این لحظه ۱۳ SCC*mec* تایپ مختلف در میان ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین شناسایی شده است که تعیین SCC*mec* تایپ یکی از ابزارهای مهم در تعیین انتشار کلونال سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین محسوب می شود (۳). مطالعه حاضر، با هدف تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و انتشار کلونال سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در ۲ بیمارستان مختلف در اصفهان به انجام رسید.

مواد و روش‌ها

جمع آوری ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس*

در بازه زمانی اردیبهشت لغایت آبان سال ۱۴۰۰، در مجموع ۱۶۳ ایزوله مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری از آزمایشگاه دو بیمارستان در شهر اصفهان جداسازی شدند. پلیتهای کشت پس از جمع آوری به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه اصفهان منتقل شدند و پس از کشت و خالص سازی بر روی محیط ژلوز کلمبیا (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) جهت بررسیهای بیشتر در محیط مغذی واجد ۵۰ درصد گلیسرول در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. جهت شناسایی و تأیید ایزوله ها آزمون PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *nuc*A مورد استفاده قرار گرفت (۱). لازم به ذکر است که تمامی بیماران ارجاع داده شده به آزمایشگاه با علائمی مانند تکرر ادرار، سوزش به هنگام دفع ادرار، گاها تب، بعضا هماچوری و کدورت ادرار به پزشک مراجعه کرده بودند.

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی

جهت شناسایی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین، از آزمون انتشار دیسک سفوکسی تین (۳۰ میکروگرم) (Mast, UK) بر روی محیط ژلوز مولر هینتون (Merck, Darmstad, Germany) بر اساس دستورالعمل Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) استفاده شد (۱۰). پس از تعیین سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم، حساسیت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیکهای آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول (۱/۲۵-۲۳/۷۵ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم)، پنی سیلین (۵

میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، ریفامپین (۲ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۳۰ میکروگرم)، کانامایسین (۳۰ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، کینوپریستین-دالفوپریستین (۱۵ میکروگرم)، مینوسایکلین (۳۰ میکروگرم) و لینزولاید (۱۰ میکروگرم) به روش انتشار از دیسک و بر اساس دستورالعمل CLSI تعیین گردید (۱۰).

بررسی تشکیل بیوفیلم

روش کیفی ژلوز قرمز کنگو

در این مطالعه به منظور بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم به روش کیفی در میان سویه ها از آزمون ژلوز قرمز کنگو استفاده شد (۳). بر این اساس، یک کلنی از کشت خالص و تازه هر ایزوله باکتری انتخاب و بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو کشت داده شد و پلیتها پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، مجددا به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند و در نهایت کلنیهای مشکی و قرمز تیره به ترتیب به عنوان سویه های مولد اسلایم و سویه های اسلایم مشکوک جهت بررسیهای بیشتر انتخاب شدند. کلنیهای قرمز روشن نیز به عنوان سویه های اسلایم و بیوفیلم منفی از بررسی خارج شدند.

روش کمی میکروتیتر پلیت

پس از تعیین سویه های اسلایم مثبت و اسلایم مشکوک به عنوان سویه های مولد بیوفیلم در آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو، توانایی تشکیل بیوفیلم در میان سویه ها به روش میکروتیتر پلیت مورد سنجش قرار گرفت (۳). برای این منظور، ابتدا یک کلنی از کشت تازه و خالص هر سویه باکتری انتخاب و در محیط تریپتیک سوی براث (TSB) (Scharlau, Sentmenat, Spain) حاوی ۰/۲۵ درصد سوکروز کشت داده شدند و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل در چاهکهای میکروپلیت (به صورت ۳ تکرار) تلقیح شد. پلیتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و پس از شست و شو، هر چاهک با استفاده از رنگ کریستال ویوله ۰/۳ درصد (Sigma, Germany) رنگ آمیز شد. سپس رنگبری با استفاده از ترکیب الکل-استن انجام گرفت و جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر با خوانشگر الایزا تعیین گردید. در نهایت سویه ها به ۴ دسته بیوفیلم قوی: جذب نوری > ۱، بیوفیلم متوسط یا نسبی: ۱ > جذب نوری > ۰/۲، بیوفیلم ضعیف: جذب نوری < ۰/۲ و بیوفیلم منفی: جذب نوری < جذب نوری کنترل تقسیم بندی شدند.

آزمونهای مولکولی

استخراج DNA

در این مطالعه از روش جوشاندن جهت استخراج DNA ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده گردید (۱۱). یک لوپ از کشت تازه و خالص هر ایزوله باکتری در میکروتیوب واجد ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر به خوبی ورتکس و حل گردید و میکروتیوبها به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه ترموبلاک با دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد جوشانده شدند. سپس میکروتیوبها در 13000 × g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و از مایع رویی به عنوان الگوی DNA استفاده گردید.

شناسایی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس*

برای شناسایی و تأیید سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* که در آزمایشگاه بیمارستانهای مورد مطالعه مورد شناسایی ابتدایی قرار گرفته بودند آزمون PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *nuc*A بر اساس دستورالعمل پیشین رحیمی و همکاران (جدول ۱) مورد استفاده قرار گرفت (۱).

بررسی حضور ژن *mec*A و SCC*mec* تایپینگ سویه ها

جهت تأیید مقاومت سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به سفوکسی تین از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) ژن *mec*A استفاده شد (۱). همچنین، به منظور تعیین وجود SCC*mec* تایپهای مختلف (I-V) در میان ایزوله های واجد ژن *mec*A از آزمون multiplex-PCR با پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) استفاده گردید (۱۲).

پروفاژ تایپینگ سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین

به منظور تعیین حضور پروفاژ تایپهای مختلف در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از آزمون multiplex-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنهای مربوط به پروفاژ تایپهای SGA، SGB، SGF (SGFa و SGFb) SGD و SGL (جدول ۱) بر اساس دستورالعمل پیشین رحیمی و همکاران استفاده گردید (۱۳).

پروفاژتایپ SGA، بر اساس دستورالعمل پیشین McClure و همکاران از آزمون PCR و پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) استفاده گردید (۱۴).

تعیین حضور ژن *pvl*

برای بررسی وجود ژن *pvl* در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه و واجد

جدول ۱- توالی پرایمرها و برنامه حرارتی مورد استفاده در آزمونهای PCR.

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه (جفت باز)	برنامه حرارتی
	F: 5′-AGTTCAGCAAATGCATCACA R: 5′-TAGCCAAGCCTTGACGAACT		
	F:5′-GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA R: 5′-CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA)		
	F: 5′-TATCAGGCGAGAATTAAGGG R: 5′-CTTTGACATGACATCCGCTTGAC F: 5′-ACTTATCCAGGTGGYGTTATTG R: 5′-TGTATTTAATTTCGCCGTTAGTG F: 5′-CGATGGACGGCTACACAGA R: 5′-TTGTTCAGAAACTTCCCAACCTG F: 5′-TACGGGAAAATATTCGGAAG R: 5′-ATAATCCGCACCTCATTCCT F: 5′-AGACACATTAAGTCGCACGATAG R: 5′-TCTTCTCTGGCACGGTCTCTT F: 5′-TGGGCTTCATTCTACGGTGA R: 5′-GTAATTTAATGAATCCACGAGAT F: 5′-GCTTAAAACAGTAACGGTGACAGTG R: 5′-TGCTACATCATCAAGAACACCTGG		
	F: GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG R: GTCTCTCATAGTATGACGTCC F: CGTTGAAGATGATGAAGCG R: CGAAATCAATGGTTAATGGACC F: CCATATTGTGTACGATGCG R: CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG F: GCCTTATTCGAAGAAACCG R: CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG F: TCTGGAATTACTTCAGCTGC R: AAACAATATTGCTCTCCCTC F: ACATATTTGTATTATCGGAGAGC R: TTGGTATGAGGTATTGCTGG F: CTCAAAATACGGACCCCAATACA R: TGCTCCAGTAATTGCTAAAG F: GAACATTGTTACTTAAATGAGCG R: TGAAAGTTGTACCCTTGACACC		
	F: ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA R: GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAAGC		

یافته ها

شناسایی سویه ها

نتایج حاصل از آزمون PCR با پرایمرهای اختصاصی *nuc*A نشان داد که تمامی ۱۶۳ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جمع آوری شده به عنوان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد تأیید قرار گرفتند. همچنین، بر اساس نتایج حاصل از آزمون تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به دیسک سفوکسی تین مشخص گردید که در مجموع ۶۱ سویه (۳۷ درصد) مقاوم به سفوکسی تین بودند و به عنوان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین انتخاب شدند. علاوه بر این، ۱۰۰ درصد سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین واجد ژن *mec*A بودند و نتایج حاصل از آزمونهای انتشار دیسک و PCR کاملا بر هم منطبق بودند. در این مطالعه، از مجموع ۶۱ سویه مقاوم به متی سیلین، ۳۴ سویه (۵۶ درصد) از بیمارستان ۱ و ۲۷ سویه (۴۴ درصد) از بیمارستان ۲ جداسازی شده بودند، که در این میان ۳۸ سویه (۶۲ درصد) و ۲۳ سویه (۳۸ درصد) به ترتیب متعلق به نمونه های ادراری خانمها و آقایان بودند. بیشترین تعداد سویه ها متعلق به بیماران در بازه سنی ۸۰-۷۱ سال (۲۱ درصد)، ۴۰-۳۱ سال (۱۹ درصد) و ۷۰-۶۱ سال (۱۸ درصد) بود.

بررسی تشکیل بیوفیلم

روش کیفی ژلوز قرمز کنگو

بر اساس نتایج حاصل از آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو مشخص شد که از ۶۱ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین شناسایی شده در این مطالعه، در مجموع ۳۹ سویه (۶۴ درصد) واجد کلنیهای مشکی بودند که به عنوان سویه های اسلایم مثبت انتخاب شدند. همچنین، ۱۳ سویه (۲۱ درصد) نیز به عنوان سویه های مشکوک (واجد کلنیهای قرمز تیره) تعیین شدند و ۹ سویه (۱۵ درصد) نیز واجد کلنیهای قرمز روشن و اسلایم منفی بودند. بنابراین، در مجموع ۵۲ سویه اسلایم مثبت و اسلایم کاذب جهت بررسی تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت انتخاب شدند.

بررسی کمی تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت

نتایج حاصل از آزمون کمی میکروتیتر پلیت نشان داد که از مجموع ۵۲ سویه اسلایم مثبت و اسلایم کاذب انتخاب شده، در مجموع ۴۳ سویه (۸۳ درصد) قادر به تشکیل بیوفیلم و اتصال به سطح پلی استیرن هر چاهک بودند. بر این اساس مشخص شد که از ۴۳ سویه بیوفیلم مثبت، ۱۹ سویه (۴۴ درصد) بیوفیلم قوی، ۱۶ سویه (۳۷ درصد) بیوفیلم متوسط و ۸ سویه (۱۹ درصد) نیز بیوفیلم ضعیف بودند. بنابراین، در مجموع ۴۳ سویه بیوفیلم مثبت جهت بررسیهای بیشتر انتخاب شدند.

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی

نتایج حاصل آزمون تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین نشان داد (جدول ۲) که تمامی سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک پنی سیلین (۱۰۰ درصد) مقاوم بودند و پس از آن بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای سیپروفلوسکاسین (۹۳ درصد)، اریترومایسین (۹۱ درصد)، توبرامایسین (۸۸ درصد)، کلیندامایسین (۸۶ درصد)، تتراسایکلین (۸۶ درصد)، آمیکاسین (۸۴ درصد) و کانامایسین (۸۴ درصد) مشاهده گردید. همچنین، تمامی سویه ها نسبت به آنتی بیوتیکهای لینزولاید و کینوپریستین-دالفوپریستین حساسیت نشان دادند. علاوه بر این، کمترین میزان مقاومت نیز نسبت به آنتی بیوتیکهای جنتامایسین (۵۳ درصد)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول (۵۶ درصد) و مینوسایکلین کانامایسین (۵۸ درصد) مشاهده گردید.

جدول ۲- فراوانی و درصد مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین* مولد بیوفیلم.

آنتی بیوتیک	فراوانی	درصد
آمیکاسین	۳۶	۸۴
اریترومایسین	۳۹	۹۱
تتراسایکلین	۳۷	۸۶
تری متوپریم-سولفامتوکسازول	۲۴	۵۶
توبرامایسین	۳۸	۸۸
پنی سیلین	۴۳	۱۰۰
جنتامایسین	۲۳	۵۳
ریفامپین	۲۸	۶۵
سیپروفلوکساسین	۴۰	۹۳
کانامایسین	۳۶	۸۴
کلیندامایسین	۳۷	۸۶
کینوپریستین-دالفوپریستین	۰	۰
مینوسایکلین	۲۵	۵۸
لینزولاید	۰	۰

پروفاژ تایپینگ سویه ها

در این مطالعه در مجموع ۴ پروفاژ تایپ SGB، SGF، SGFa و SGFb در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین شناسایی گردید (جدول ۳) و تمامی سویه ها واجد پروفاژ تایپهای SGF، SGFa و SGFb بودند. همچنین، پروفاژ تایپهای SGA، SGD و SGL در هیچکدام از سویه ها شناسایی نشد. علاوه بر این، در مجموع ۲ الگوی پروفاژی نیز در میان سویه ها شناسایی شد که الگوی شماره ۲ (۷۲ درصد) شامل هر ۴ پروفاژ تایپ به عنوان الگوی پروفاژی غالب انتخاب شد.

جدول ۳- فراوانی پروفاژ تایپها و الگوهای پروفاژی مختلف در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین.

الگوی پروفاژی	پروفاژ تایپ				فراوانی	درصد
	SGB	SGF	SGFa	SGFb		
۱	-	+	+	+	۱۲	۲۸
۲	+	+	+	+	۳۱	۷۲

SCC*mec* تایپینگ سویه ها

بر اساس نتایج حاصل از آزمون multiplex-PCR شناسایی SCC*mec* تایپهای مختلف در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم مشخص گردید که تنها دو SCC*mec* تایپ II و III در میان سویه ها شناسایی شدند و هیچکدام از سویه ها واجد SCC*mec* تایپهای I، IV و V نبودند. بر این اساس، ۹۳ درصد سویه ها (۴۰ سویه) واجد تایپ III و ۳ سویه (۷ درصد) نیز واجد تایپ II بودند؛ بنابراین ۱۰۰ درصد سویه ها به عنوان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیمارستان طبقه بندی شدند. همچنین نتایج حاصل از شناسایی ژن *pvl* نشان داد که این ژن در هیچکدام از سویه ها شناسایی نشد.

بحث

عفونتهای دستگاه ادراری به عنوان دومین عفونت شایع با پیچیدگیها و عوارض فراوان شناخته می شوند که بخش بزرگی از جمعیت انسانی به ویژه زنان را در جهان تحت تأثیر قرار می دهند و اعتقاد بر این است که هر خانم در طول زندگی خود حداقل یک مرتبه با عفونت ادراری مواجه می شود (۱۵). عفونتهای ادراری معمولا در ابتدا به شکل تک گیر در افراد مشاهده می شوند که در صورت عدم تشخیص صحیح عامل بیماری و درمان نامناسب مبدل به عفونت عود شونده خواهد شد که درمان را با سختی مواجه می سازد. عود عفونت عموما ناشی از توانایی تشکیل بیوفیلم توسط باکتریها است (۳). تشکیل بیوفیلم باعث می شود که باکتریها بتوانند سیستم ایمنی را تحمل کنند و در برابر عوامل ضدمیکروبی و انواع آنتی بیوتیکها از جمله متی سیلین مقاومت نشان دهند که در نهایت منجر به تشکیل یک مخزن مهم برای ایجاد عفونتهای مداوم و مکرر در دستگاه ادراری می شود. *استافیلوکوکوس اورئوس* از جمله باکتریهای بیماریزای شاخص ایجاد عفونت ادراری در جهان شناخته می شود که واجد انواع مختلفی از عوامل حدت می باشد و از مقاومت بالایی نیز نسبت به عوامل ضدمیکروبی از جمله طیف وسیعی از آنتی بیوتیکها برخوردار می باشد. این باکتری قادر به تولید بیوفیلم بر روی سطوح مختلف از جمله، سلولهای اپیتلیال، سوندهای ادراری، پروتزها و ابزارهای پلاستیکی است (۷).

در مطالعه حاضر ۳۷ درصد سویه های مورد بررسی مقاوم به متی سیلین بودند. تاکنون آمار متفاوتی از فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در بیماران شهرهای مختلف کشور ارائه شده است (۱۹/۲-۶۸ درصد) (۱, ۳, ۴, ۸, ۲۶-۱۶). به طور کلی می توان گفت که تفاوت در فراوانی سویه ها در شهرهای کشور در سالهای مختلف می تواند ناشی از تفاوت در نمونه های مورد مطالعه، تفاوت در شرایط جغرافیایی و فرهنگی شهرهای مختلف، سیاستهای کنترل عفونت اتخاذ شده در هر بیمارستان و شهر، بستری یا سرپایی بودن بیماران مورد بررسی و تفاوت در روشهای سنجش مقاومت آنتی بیوتیکی باشد. بر اساس مطالعات انجام گرفته در سالهای گذشته در بیمارستانهای مذکور فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین افزایش پیدا کرده است (حدودا ۸ درصد در مدت ۵ سال) که این اتفاق مؤید ناکارآمدی سیاستهای کنترل عفونت در بیمارستانهای مورد مطالعه است و در صورت عدم توجه و کنترل این سویه ها، در سالهای آینده با شیوع بیشتری نیز مواجه خواهیم بود.

در این پژوهش به منظور تعیین و انتخاب سویه های مولد بیوفیلم از ترکیبی از روشهای کمی میکروتیتر پلیت کیفی و ژلوز قرمز کنگو استفاده گردید. بر این اساس، ۸۵ درصد سویه های

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو سویه های اسلایم مثبت و اسلایم کاذب بودند و ۸۳ درصد سویه ها نیز در آزمون کمی میکروتیتر پلیت به عنوان سویه های بیوفیلم مثبت انتخاب شدند. در شهرهای مختلف گزارشات متفاوتی در مورد سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد بیوفیلم گزارش منشتر شده است (۶۷-۹۴ درصد) (۳, ۸, ۱۹, ۲۱, ۲۹-۲۵). با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و سایر مطالعات می توان اذعان داشت که روش کیفی ژلوز قرمز کنگو در مقایسه با روش کمی میکروتیتر پلیت از حساسیت و اختصاصیت پایینتری برخوردار است و توصیه می شود که جهت تعیین دقیق تشکیل بیوفیلم از روش میکروتیتر پلیت استفاده شود و از روش ژلوز قرمز کنگو نیز می توان به عنوان یک روش غربالگری پیش از استفاده از روش کمی استفاده نمود.

تمامی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در این مطالعه نسبت به پنی سیلین مقاوم بودند و مقاومت بالایی نیز نسبت به آنتی بیوتیکهای سیپروفلوکساین، اریترومایسین، توبرامایسین، کلیندامایسین، تتراسایکلین، آمیکاسین و کانامایسین مشاهده گردید. این یافته ها کاملا منطبق بر مطالعات پیشین است (۱, ۳, ۴, ۱۱, ۱۷-۱۹, ۲۱, ۲۳, ۳۲-۳۰) که نشان دهنده عدم کارایی این آنتی بیوتیکها جهت درمان عفونتهای ناشی از سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین می باشند. همچنین، تمامی سویه ها نسبت به لینزولاید و کینوپریستین-دالفوپریستین حساسیت نشان دادند. در آن مطالعات نیز مقاومتی نسبت به این آنتی بیوتیکها گزارش نشده است و به نظر می رسد که بر اساس نتایج مطالعه حاضر بهترین آنتی بیوتیکها جهت درمان عفونتهای ناشی از سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین محسوب می شوند.

بر اساس نتایج آزمون SCC*mec* تایپینگ سویه ها مشخص گردید که تنها دو SCC*mec* تایپ II (۷ درصد) و III (۹۳ درصد) در میان سویه ها شناسایی شدند که این تایپها شاخص سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیمارستان می باشند، بنابراین تمام سویه های جمع آوری شده در هر دو بیمارستان منشاء بیمارستانی داشتند. در تمامی مطالعات انجام گرفته بر روی سویه های مقاوم به متی سیلین جداسازی شده از نمونه های بالینی، دام و طیور، مواد غذایی و فاصلاب در کشور همواره SCC*mec* تایپ III به عنوان فراوانترین و غالبترین تایپ گزارش شده است (۱, ۳, ۴, ۱۱, ۱۷, ۱۸, ۲۰, ۲۱, ۲۳, ۲۵, ۳۲, ۳۳). بنابراین به نظر می رسد بیشتر سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین در گردش در کشور منشاء بیمارستانی دارند و در اثر عدم رعایت اصول بهداشتی و کنترل عفونت از بیمارستانها در جامعه در تمام کشور منتشر شده اند و به عنوان کلون تایپهای غالب در بیمارستان و جامعه در حال انتقال و گردش می باشند.

نتایج حاصل از آزمون پروفاژ تایپینگ سویه ها نشان داد که هیچکدام از سویه ها واجد پروفاژ تایپ SGA نبودند و پروفاژ تایپ SGF و ساب تایپهای SGFa و SGFb تایپهای غالب بوده و در تمامی سویه ها شناسایی شدند. در تمامی مطالعات انجام گرفته بر روی انواع نمونه ها، همواره پروفاژ تایپ SGF و ساب تایپهای SGFa و SGFb به عنوان تایپهای غالب در کشور گزارش شده اند و تقریبا در ۱۰۰ درصد موارد گزارش شده اند (۳, ۱۱, ۱۳, ۲۰, ۲۱, ۲۵-۲۳, ۳۲, ۳۴). همچنین، در این مطالعه تنها دو الگوی پروفاژی شناسایی گردید که این یافته بر خلاف سایر گزارشات می باشد. به نظر می رسد این امر نشان دهنده محدود بودن کلون تایپهای در گردش در بیمارستانهای مورد مطالعه در شهر اصفهان باشد. حضور همزمان SGB و SGF و ساب تایپهای SGFa و SGFb در سویه ها نشان دهنده توانایی بالقوه این سویه ها برای تولید طیف وسیعی از عوامل حدت از قبیل انتروتوکسینهای A، G، K، P و Q، بتا-لایزین، استافیلوکیناز، لوکوسیدین، لیپاز، TSST-1 و اکسفولیاتیو توکسین A می باشد (۳۵, ۳۶). علاوه بر این، عدم حضور پروفاژ تایپ SGA در میان سویه ها کاملا منطبق بر نتایج آزمونهای SCC*mec* تایپینگ و همچنین شناسایی ژن *pvl* بود که هیچکدام از سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه نبودند. چنانچه پیشتر در سال ۲۰۱۴ اعلام شد، حضور پروفاژ تایپ SGA که خود رمز کننده لوکوسیدین پنتون-ولنتاین می باشد تنها محدود به سویه های اکتسابی از جامعه است و همانند ژن *pvl* می تواند جهت تعیین سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه مورد توجه باشد (۱). بنابراین، با توجه به اینکه روشهای معمول مورد استفاده برای شناسایی پروفاژها که بیشتر مبتنی بر القاء پروفاژ از ایزوله های لیزوژنیک می باشند بسیار طولانی، زمانبر و دشوار هستند، لذا برای بررسیهای معمول چندان مناسب نیستند. به همین دلیل روشهای مولکولی مبتنی بر PCR یک روش بسیار سریع و اختصاصی جهت تایپینگ سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین به شمار می روند (۱۳, ۳۷).

نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه می توان اذعان داشت که فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم در شهر اصفهان بالا است و نسبت به سالهای پیش نیز افزایش پیدا کرده است. این سویه ها که منشاء بیمارستانی دارند از مقاومت بالایی نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیکهای معمول درمان عفونتهای ادراری برخوردار هستند و قادر به تولید انواع مختلفی از عوامل حدت نیز می باشند. ظهور و انتشار سریع باکتریهای بیماریزای مولد بیوفیلم و مقاوم به آنتی بیوتیکها، یکی از مهمترین تهدیدات برای سلامتی انسان محسوب می شوند. بنابراین لازم است که به منظور جلوگیری از عود عفونت، درمان صحیح و قطعی عفونت با آگاهی از الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها انجام گیرد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه اصفهان به انجام رسیده است.

REFERENCE

1. 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.
2. Shrivastava SR, Shrivastava PS, Ramasamy J. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Journal of Medical Society. 2018;32(1):76.
3. 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.
4. 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.
5. Danesh M, Rahimi F. Characterization of biofilm producing *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and healthy people. Infection Epidemiology and Microbiology. 2021;7(1):1-15.
6. Penesyan A, Gillings M, Paulsen IT. Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. Molecules. 2015;20(4):5286-98.
7. Silva V, Almeida L, Gaio V, Cerca N, Manageiro V, Caniça M, et al. Biofilm formation of multidrug-resistant MRSA strains isolated from different types of human infections. Pathogens. 2021;10(8):970.
8. Karimi A, Rahimi F. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infection in a hospital in Isfahan during 2016. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2019;24(86):26-35.
9. Cascioferro S, Carbone D, Parrino B, Pecoraro C, Giovannetti E, Cirrincione G, et al. Therapeutic strategies to counteract antibiotic resistance in MRSA biofilm-associated infections. ChemMedChem. 2021;16(1):65-80.
10. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 31th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2021.
11. Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in sewage treatment plants in Tehran, Iran. Journal of Water and Health. 2021;19(2):216-28.
12. Zhang K, McClure J-A, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology. 2005;43(10):5026-33.
13. 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.
14. McClure J-A, Conly JM, Lau V, Elsayed S, Louie T, Hutchins W, et al. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from-resistant staphylococci. Journal of Clinical Microbiology. 2006;44(3):1141-4.
15. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Clonal groups of extended-spectrum β-lactamase and biofilm producing uropathogenic *Escherichia coli* in Iran. Pathogens and Global Health. 2022;116(8):485-97.

16. Karimi A, Rahimi F. Typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infection in Isfahan during 2017 Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2019;24(87):43-50.
17. 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.
18. 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.
19. Rahimi F. Isolation of biofilm producing methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* strains from patients with urinary tract infection in Isfahan. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2018;23(82):37-44.
20. Rahimi F, Danesh M, Mehmandoost J, Shokri D. Prophage typing and SCC*mec* typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients in Isfahan. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2016;20(71):49-58.
21. 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.
22. Rahimi F, Pourshafie MR. Aminoglycoside resistance among meticillin resistant *Staphylococcus aureus* strains ssolated from two hospitals in Tehran Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2015;20(69):55-61.
23. Rahimi F, Qasemi A. Epidemiological link between methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from 2 different cities in Iran. Infectious Diseases in Clinical Practice. 2019;27(3):163–9.
24. Rahimi F, Shokoohizadeh L. Characterization of virulence factors and prophage profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a referral hospital in Tehran, Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2018;13(5):e59385.
25. Rahimi F, Mohaghegh F, Mostafavi NS. Clonal dissemination of biofilm producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infection in Tehran, Karaj and Isfahan during 2018. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2020;25(8916-25).
26. Mostafavi NS, Mohaghegh F, Rahimi F. Phenotypic comparison of biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients in Tehran and Isfahan. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2020;25(91):15-21.
27. 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.
28. 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.
29. Kadkhoda H, Ghalavand Z, Nikmanesh B, Kodori M, Houri H, Maleki DT, et al. Characterization of biofilm formation and virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolates from paediatric patients in Tehran, Iran. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2020;23(5):691.
30. Rahimi F, Bouzari M. Biochemical fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from sewage and hospital in Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2015;8(7):e19760.
31. 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. 2014;18(62):17-22.

32. Rahimi F, Shafiei R. Characteristics of enterotoxin-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from meat in Tehran, Iran. Journal of Consumer Protection and Food Safety. 2019;14(4): 389–98.
33. Rahimi F, Karimi S, Pourshafie MR. Typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients in Isfahan. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2014;19(64):21-30.
34. Rahimi F, Karimi S. Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from poultry in Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2015;10(4):e30885.
35. 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.
36. Workman M, Nigro O, Steward G. Identification of prophages in coastal water isolates of *Staphylococcus aureus*. Journal of Young Investigators. 2006;15:1-8.
37. 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.