ORIGINAL ARTICLE

Biofilm Formation and Presence of ica Genes in Staphylococcus aureus Isolated from Intensive Care Unit

Mohsen Mirzaee[1],
Shahin Najar-Peerayeh[2],
Mehrdad Behmanesh[3],
Mahdi Forouzandeh Moghadam[4],
Abdol-Majid Ghasemian[1]

[1] PhD Student in Medical Bacteriology, Department of Medical Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2] Associate Professor, Department of Medical Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3] Associate Professor, Department of Genetics, School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[4] Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received February 4, 2014; Accepted July 13, 2014)

Abstract

Background and purpose: *Staphylococcus aureus* is recognized as the most important pathogen responsible for nosocomial infections, mainly pneumonia, bloodstream infections, and surgical site infection. It also remains a major cause of community-acquired infections. The possibility of biofilm formation on the surface and implicated devices such as catheters is one of the most important virulence factors in *S.aureus.* The aim of this study was to investigate the biofilm formation ability and presence of *ica* genes in clinical isolates of *S.aureus* from intensive care unit.

Material and methods: A total of 72 clinical *S. aureus* isolates was collected from three hospitals in Tehran. Antibiotic susceptibility testing was performed as recommended by the CLSI for 11 antibiotics using disk diffusion method. Ability of biofilm formation was measured by Microtiter plate assay. All isolates were then examined for presence of the *icaABCD* genes.

Results: The microtiter plate assay results showed that attachment abilities in 26 (36.1%) strains were strong, in 30 (41.6%) strains were moderate, and in 16 (22.3%) strains were weak. The prevalence of the *icaA*, *icaB*, *icaC* and *icaD* genes among the studied isolates was as follows: *icaA* positive: 42 (58.3%), *icaB* positive: 34 (47.2%), *icaC* positive: 46 (63.8%) and *icaD*: 50 (69.5%).

Conclusion: Our results suggest different biofilm formation ability in clinical isolates of *S.aureus*. Biofilm formation on devices such as intravascular catheters can increase the risk of infection. Moreover, bacterial biofilms show increased tolerance to antibiotics. This is a serious problem in medical centers specially, in intensive care units.

Keywords: *Staphylococcus aureus,* biofilm, *icaABCD*genes, Microtiter plate assay

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(115): 43-51 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۵ مرداد سال ۱۳۹۳ (۵۱-۴۳)

تشکیل بیوفیلم و حضور ژن های *ica* در ایزوله های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بخش مراقبت های ویژه

محسن میرزایی[۱]
شهین نجار پیرایه[۲]
مهرداد بهمنش[۳]
مهدی فروزنده مقدم[۴]
عبدالمجید قاسمیان[۱]

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی از جمله پنومونی، عفونت حاصل از جراحی و عفونت خون بوده و هم‌چنین به عنوان یک عامل اصلی مولد عفونت‌های اکتسابی جامعه می‌باشد. توانایی اتصال به سطوحی از قبیل کاتترها و تشکیل بیوفیلم یکی از مهم‌ترین عوامل موثر در توانایی بیماریزایی این باکتری محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی تشکیل بیوفیلم و حضور ژن‌های *ica* درجدایه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از بخش مراقبت‌های ویژه است.

مواد و روش‌ها: طی سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۹۱ تعداد ۷۲ جدایه بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* از ۳ بیمارستان شهر تهران جمع‌آوری گردید. حساسیت آنتی‌بیوتیکی بر اساس روش‌های استاندارد CLSI تعیین گردید. توانایی تشکیل بیوفیلم در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از روش میکروپلیت سنجیده شد. سپس تمامی جدایه‌ها از نظر حضور ژن‌های *icaABCD* با استفاده از روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: آزمایش حساسیت ضد میکروبی نشان داد که ۲۸ درصد جدایه ها مقاوم به اگزاسیلین بودند و در هیچ یک از جدایه مقاومت نسبت به ونکومایسین و لینوزولاید مشاده نگردید. تشکیل بیوفیلم در ۲۶ جدایه (۳۶/۱ درصد) قوی، در ۳۰ جدایه (۴۱/۶ درصد) متوسط و در ۱۶ جدایه (۲۲/۳ درصد) ضعیف گزارش گردید. ۴۲ جدایه (۵۸/۳ درصد) واجد ژن *icaA*، ۳۴ جدایه (۴۷/۲ درصد) واجد ژن *icaB*، ۴۶ جدایه (۶۳/۸ درصد) واجد ژن *icaC* و ۵۰ جدایه (۶۹/۵ درصد) واجد ژن *icaD* بوده‌اند.

استنتاج: جدایه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* توانایی متفاوتی در تشکیل بیوفیلم دارند. اتصال و تشکیل بیوفیلم توسط باکتری روی وسایلی از قبیل سوندهای درون عروقی می‌تواند خطر ابتلا به عفونت را افزایش دهد. علاوه بر این، باکتری‌های درون بیوفیلم به سختی توسط آنتی‌بیوتیک‌ها از بین می‌روند، که این پدیده در بخش‌های درمانی و به‌خصوص بخش مراقبت‌های ویژه می‌تواند مشکلات جدی را ایجاد نماید.

واژه های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، بیوفیلم، ژن‌های *icaABCD*، میکرو تیتر پلیت اسی

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل اصلی مولد عفونت‌های بیمارستانی، به خصوص بیماری‌هایی از قبیل پنومونی و عفونت‌های جریان خون بوده و هم‌چنین به عنوان یک عامل اصلی ایجاد کننده عفونت‌های

مولف مسئول: شهین نجار پیرایه – تهران: دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، صندوق پستی: ۱۵۸-۱۴۱۱۵ E-mail: Najarp_s@modares.ac.ir
۱. دانشجوی دکترای باکتری شناسی پزشکی، گروه باکتری شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲. دانشیار، گروه باکتری شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۱۱/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۲/۳۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۴/۲۲

اکتسابی جامعه مطرح می‌باشد(۲،۱). یکی از عوامل موثر در بیماری‌زایی این باکتری توانایی تشکیل بیوفیلم است. بیوفیلم باعث افزایش مقاومت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تجویزی و هم‌چنین مکانیسم‌های دفاعی میزبان می‌شود. این مقاومت افزایش یافته باکتری نسبت به عوامل ذکر شده در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی نقش ویژه‌ای ایفا می‌کند(۳). ایجاد عفونت‌های بیمارستانی در بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه معمولاً با استفاده از وسایل تهاجمی از قبیل ونتیلاتورهای مکانیکی، کاتترهای وریدی و ادراری مرتبط است. بسیاری از عفونت‌های ناشی از این وسایل در ارتباط با آلودگی توسط میکروارگانیسم‌ها و فراهم شدن شرایط ایجاد بیوفیلم است(۴). بیوفیلم‌ها ساختارهایی متشکل از مجموعه‌ای از باکتری‌ها هستند که در یک ماتریکس پلیمری که خود باکتری‌ها تولید می‌کنند، محصور شده و می‌توانند به سطوح مختلف متصل شوند(۵). محققین نشان داده‌اند که مرحله اول در عفونت‌زایی *استافیلوکوکوس اورئوس* اتصال این باکتری به سطوحی از قبیل ابزارهای پزشکی، بافت‌های میزبان و غیره است که به ترکیبی از عوامل خارج سلولی مانند توانایی اتصال و تشکیل بیوفیلم نسبت داده می‌شود(۶). این مرحله توسط پلی ساکارید چسبنده بین سلولی یا PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesion) که پروتئین‌های عوامل اتصالی بین سلولی *IcaA*، *IcaB*، *IcaC* و *IcaD* در تولید آن دخالت دارند واسطه‌گری می‌شود. این مجموعه روی یک اپران واقع شده‌اند(۷-۹). این پلی‌ساکارید پلیمری از واحدهای گلیکوز- آمینوگلیکان با اتصال بتا ۱ و ۶ (۸۰ تا ۸۵ درصد) و بخش کوچک‌تر گلیکوز آمینیل‌های غیر استیله آنیونی حاوی فسفات و سوکسینات- استر (۲۰ تا ۲۵ درصد) می‌باشد که توسط آنزیم ان- استیل گلوکز آمینیل ترانسفراز سنتز می‌شود. بیان این آنزیم توسط لوکوس *ica* انجام می‌شود. سنتز این پلی ساکارید در پی بیان آنزیم مربوطه توسط *icaA* صورت می‌گیرد. مشارکت *icaD* با این لوکوس موجب افزایش سنتز پلی ساکارید و ایجاد فنوتیپ کپسولی می‌گردد. نقش ژن *icaB* د- استیله کردن پلی ساکارید قبل از اتصال به غشای سلولی بوده و ژن *icaC* یک پروتئین غشایی را کد می‌کند که به طویل‌سازی و ترشح این پلی‌ساکارید از سلول کمک می‌کند. بیان و اپران *icaADBC* توسط سیستم‌های تنظیمی از قبیل *SarA* و سیگما B (*SigB*) افزایش می‌یابد. از سوی دیگر *icaR* به عنوان یک کنترل‌کننده منفی قوی با اتصال به ناحیه راه انداز (پروموتر) اوپران *ica* می‌تواند باعث کاهش بیان ژن‌های موجود در این اپران گردد. علاوه بر موارد ذکر شده، سیستم *agr* نیز در توانایی باکتری در ایجاد بیوفیلم و تنظیم تولید پروتئین‌های اتصالی و ترشحی نقش قابل توجهی دارد(۱۰). پلی‌ساکارید چسبنده بین سلولی به عنوان عوامل اصلی تشکیل دهنده بیوفیلم درگونه‌های استافیلوکوکی مطرح هستند. اخیرا نقش بیوفیلم در ایجاد عفونت‌های بالینی و نقش ژن‌های مختلف دخیل در اتصال و تشکیل بیوفیلم مورد توجه قرار گرفته است. جدایه‌های حاصل از نمونه‌ها و بخش‌های مختلف می‌توانند توانایی متفاوتی در اتصال و تشکیل بیوفیلم داشته باشند(۱۱). هدف از انجام این تحقیق، بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم و بررسی حضور ژن‌های *ica* در جدایه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های منتخب شهر تهران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

طی سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۹۱، تعداد ۷۲ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های بالینی سه بیمارستان در تهران جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) مورد بررسی قرارگرفت. تمامی جدایه‌ها توسط روش‌های معمول باکتری شناسی نظیر رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش‌های بیوشیمیایی کاتالاز، کوآگولاز، عامل کلامپینگ، تخمیر مانیتول و DNase مورد شناسایی و تایید قرار گرفتند. برای کلیه آزمایش‌ها از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923* به عنوان کنترل استفاده شد.

آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های مورد بررسی نسبت به ۱۱ آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین (1µg)، جنتامایسین (10µg)، آمیکاسین (30µg)، سیپروفلوکساسین (5µg)، ونکومایسین (10µg)، تتراسیکلین (30 µg)، کوتریموکسازول (1.25 + 23.75µg)، ریفامپین (5µg)، کلیندامایسین (10µg)، اریترومایسین (15µg) و لینوزولید (30µg) (Mast.UK) با استفاده از روش Kirby-Bauer، طبق دستورالعمل انستیتو استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) انجام شد. در این روش، سوسپانسیونی از باکتری با کدورتی معادل استاندارد نیم مک فارلند در محیط مولر هینتون براث تهیه گردید، سپس با استفاده از سواب استریل روی سطح محیط مولر هینتون آگار تلقیح و دیسک‌ها با فاصله مناسب روی سطح محیط قرار داده شدند. هاله عدم رشد هر یک از دیسک‌ها بعد از گرم خانه‌گذاری به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شدند(۱۲).

توانایی تشکیل بیوفیلم

توانایی تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های مورد بررسی با روش میکروتیتر پلیت انجام شد. به صورت خلاصه، ۱۸۰ میکرولیتر محیط تریپتی کیس سوی براث حاوی یک درصد گلوکز درون چاهک‌های میکروتیترپلیت ریخته شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با کدورتی معادل استاندارد نیم مک‌فارلند در محیط تریپتی کیس سوی براث به هر چاهک اضافه شد (به منظور کاهش خطا و ارائه تجزیه تحلیل قابل اعتماد نتایج، برای هر جدایه باکتری حداقل سه چاهک در نظر گرفته شد). سپس پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار داده شدند. برای حذف باکتری‌های متصل نشده، چاهک‌ها با استفاده از بافر PBS سه بار شست و شو داده شدند. آن گاه باکتری‌های موجود در بیوفیلم در کف چاهک‌ها با استفاده از ۱۵۰ میکرولیتر متانل به مدت ۲۰ دقیقه ثابت شدند، سپس متانل باقی مانده را از پلیت‌ها خارج کرده و به مدت یک شب به منظور خشک شدن، در دمای اتاق قرار داده شدند. بعد از این مرحله، به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از ۱۵۰ میکرولیتر رنگ سافرانین ۰/۰۱ درصد عمل رنگ‌آمیزی انجام شد و پلیت‌ها با استفاده از جریان آب تا خارج شدن کامل رنگ شست و شو شدند و در مجاورت هوا خشک شدند، آن گاه با اضافه کردن ۱۵۰ میکرولیتر اتانل ۹۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه رنگ متصل شده به باکتری‌های موجود در بیوفیلم را از آن‌ها جدا کرده و در طول موج ۴۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELIZA reader، حداکثر طول موج جذبی (OD) هر چاهک خوانده شد. توانایی تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌های مورد بررسی بر مبنای میزان جذب سافرانین متصل شده به سلول‌های موجود در بیوفیلم طبقه بندی گردیدند. با استفاده از روش محاسبه cut-off نتایج حاصل مورد بررسی قرار گرفت(۱۱). در این مطالعه از *استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 35556* به‌عنوان کنترل مثبت تولید کننده قوی بیوفیلم و از *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ATCC 12228* به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. روش محاسبه مقادیر cut-off برای هر گروه در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول شماره ۱: طبقه بندی توانایی تشکیل بیوفیلم به وسیله روش میکروتیتر پلیت

توانایی تشکیل بیوفیلم	محاسبه میزان cut-off	نتایج حاصل از میانگین حداکثر جذب نور (OD^1)
قوی	$OD > 4\times ODc^2$	$OD > 0.33296$
متوسط	$2\times ODc < OD \leq 4\times ODc$	$0.16648 < OD \leq 0.33296$
ضعیف	$ODc < OD \leq 2\times ODc$	$0.08324 < OD \leq 0.16648$
عدم اتصال	$OD \leq 0.08324$	$OD \leq 0.08324$

[1]Optical density
[2]ODc = average of OD negative control + (3×SD of negative control)

روش PCR برای شناسایی ژن های icaABCD

برای استخراج DNA از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، ابتدا سوسپانسیونی ازچندین کلنی هر جدایه در ۲۰ میکرولیتر بافر لیز (0.25% SDS, 0.05 N NaOH) تهیه شد، و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه قرار گرفت. سپس سوسپانسیون را در دور g ۱۶۰۰۰

به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و از مایع رویی به عنوان منبعی برای DNA استفاده شد.

واکنش PCR با ترکیب مخلوط اصلی با حجم ۲۵ میکرولیتر متشکل از ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR، ۰/۶۲۵ میکرولیتر از مخلوط dNTP، ۰/۷۵ میکرولیتر از کلرید منیزیوم ۵۰ میلی مولار، ۰/۴ میکرولیتر از آنزیم Taq پلی‌مراز، ۱۰ پیکو مول از هر پرایمر، ۴ میکرولیتر از DNA الگو و ۱۵/۷۳ میکرولیتر آب مقطر انجام گرفت. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندرف (Master cycler® gradient) انجام گرفت. برنامه‌ها و توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های *ica* در جدول شماره ۲ آورده شده است(۱۳). برای مشاهده محصولات PCR، از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. هم‌چنین برای تعیین اندازه محصولات PCR از مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (Qiagen) استفاده شد.

یافته ها

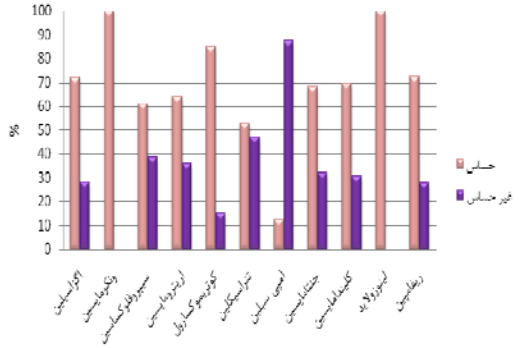
از ۷۲ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بخش مراقبت های ویژه موجود در این مطالعه، ۵۱ (۷۰/۸ درصد) جدایه از نمونه تراشه، ۸ (۱۱/۲ درصد) جدایه از نمونه کشت خون، ۸ (۱۱/۲ درصد) جدایه از نمونه زخم، ۲ (۲/۸ درصد) جدایه از نمونه ادرار و باقی جدایه ها با فراوانی برابر ۱ (۱/۴ درصد) از نمونه‌های ترشحات چشم و خلط جدا شدند. نتایج حاصل از آزمایش بررسی حساسیت ضد میکروبی نشان داد که ۲۰ جدایه (۲۸ درصد) مقاوم به اگزاسیلین، ۲۸ جدایه (۳۸/۸ درصد) مقاوم به سیپروفلوکساسین، ۲۶ جدایه (۳۶ درصد) مقاوم به اریترومایسین، ۱۱ جدایه (۱۵/۲ درصد) مقاوم به کوتریموکسازول، ۳۴ جدایه (۴۷/۲ درصد) مقاوم به تتراسیکلین، ۶۳ جدایه (۸۷/۵ درصد) مقاوم به آمپی‌سیلین، ۲۳ جدایه (۳۲ درصد) مقاوم به جنتامایسین، ۲۲ جدایه (۳۰/۵ درصد) مقاوم به کلیندامایسین و ۲۰ جدایه (۲۷/۷ درصد) مقاوم به ریفامپین بودند که در نمودار شماره ۱ آورده شده است. لازم به ذکر است که در هیچ یک از جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق مقاومت نسبت به ونکومایسین و لینوزولاید مشاهده نشد. از بین جدایه‌های مورد بررسی ۱۰ جدایه نسبت به همه آنتی‌بیوتیک‌ها به جز ونکومایسین و لینوزولاید مقاوم بودند.

در نتایج حاصل از بررسی فنوتیپی توانایی تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش میکروتیتر پلیت (Mtp) مشخص گردید که تمامی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم را در مقادیر مختلف داشتند. توانایی اتصال در ۲۶ جدایه (۳۶/۱ درصد) قوی، در ۳۰ جدایه (۴۱/۶ درصد) متوسط و در ۱۶ جدایه (۲۲/۳ درصد) ضعیف به دست آمد.

نتایج حاصل از واکنش PCR (تصویر شماره ۱) نشان‌دهنده فراوانی حضور ژن‌های *icaABCD* در جدایه‌های مورد بررسی می‌باشد که به ترتیب ۴۲ جدایه (۵۸/۳ درصد) واجد ژن *icaA*، ۳۴ جدایه (۴۷/۲ درصد) واجد ژن *icaB*، ۴۶ جدایه (۶۳/۸ درصد) واجد ژن *icaC* و ۵۰ جدایه (۶۹/۵ درصد) واجد ژن *icaD* بودند. در

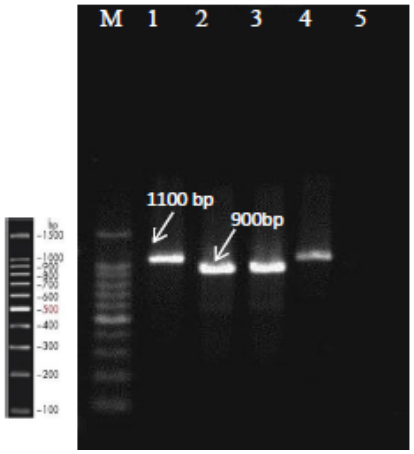
جدول شماره ۲: ترادف پرایمرهای مورد استفاده و برنامه PCR مورد استفاده به منظور تکثیر ژن های *icaABCD*[1]

ژن های هدف	توالی پرایمرها	شرایط PCR	اندازه محصول (جفت باز)	منبع
icaA	F: ACACTTGCTGGCGCAGTCAA R: TCTGGAACCAACATCCAACA	60s 94°C, 30 s 55°C, 60 s 72°C	۱۸۸	۹
icaB	F: AGAATCGTGAAGTATAGAAAATT R: TCTAATCTTTTTCATGGAATCCGT	60s 94°C, 30 s 52°C, 75 s 72°C	۹۰۰	۹
icaC	F: ATGGGACGGATTCCATGAAAAAGA R: TAATAAGCATTAATGTTCAATT	60s 94°C, 60 s 55°C, 30 s 72°C	۱۱۰۰	۹
icaD	F: ATGGTCAAGCCCAGACAGAG R: AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA	30s 94°C, 30 s 55°C, 60 s 72°C	۱۹۸	۹

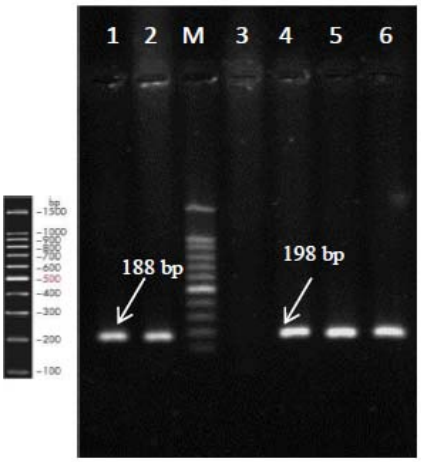


نمودار شماره ۱ : بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی با روش دیسک دیفیوژن

الف



ب



تصویر شماره ۱: بررسی حضور ژن های *icaABCD* در *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش PCR. M: سایز مارکر 100bp (qiagen). الف)۱: کنترل مثبت (*icaA*)، ۲: ایزوله بالینی دارای ژن *icaA*، ۳: کنترل منفی (آب مقطر)، ۴: کنترل مثبت (*icaD*)، ۵ و ۶ ایزوله های بالینی دارای ژن *icaD*. ب) ۱: کنترل مثبت (*icaC*)، ۲: کنترل مثبت (*icaB*)، ۳: ایزوله بالینی دارای ژن *icaB*، ۴: ایزوله بالینی دارای ژن *icaC*، ۵: کنترل منفی (آب مقطر).

۲۰ جدایه (۲۷/۸ درصد) از *استافیلوکوکوس اورئوس*های مورد بررسی، تمامی ژن‌های *icaABCD* حضور داشتند. در بین این جدایه‌ها ۱۱ (۵۵ درصد) سویه دارای توانایی تشکیل بیوفیلم قوی و ۹ جدایه (۴۵ درصد) دارای توانایی تشکیل بیوفیلم متوسط بودند.

بحث

اتصال سلول‌های میکروبی به سطوح و تجمع این سلول‌ها در تشکیل خوشه‌های سلولی چندلایه (بیوفیلم)، یک مرحله کلیدی در ایجاد عفونت می‌باشد. در این راستا، چسبندگی به‌عنوان یکی از عوامل بیماری‌زای مهم در *استافیلوکوکوس اورئوس* در نظر گرفته می‌شود(۱۴). برای بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه وسایلی از قبیل اندام‌های مصنوعی، کاتترهای ادراری و سوندهای درون عروقی با فراوانی بیش‌تری به کار برده می‌شود. از سوی دیگر باکتری‌هایی که روی سطوح فوق می‌چسبند و بیوفیلم تشکیل می‌دهند توسط آنتی‌بیوتیک‌ها به سختی از بین می‌روند(۳). گزارش‌های متعددی در خصوص الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها انتشار یافته است(۱۸-۱۵). در مطالعه ما سطح بالایی از مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین و سطح متوسط از مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین، تتراسیکلین و کلیندامایسین مشاهده شد، این در حالی است که بیش از ۲۸ درصد از جدایه‌های موجود در این مطالعه نسبت به اگزاسیلین مقاوم بودند. چنان چه باکتری‌ها در شرایط بیوفیلم قرار بگیرند، این سطح از مقاومت به مراتب بالاتر رفته و درمان را با مشکل روبه رو خواهد نمود. با توجه به شرایط جسمانی بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه، طولانی شدن یا عدم درمان می‌تواند مشکلات جدی برای این بیماران ایجاد نماید(۱۹). در مطالعه حاضر، داروهایی از قبیل سیپروفلوکساسین و ریفامپین از خود اثرات آنتی بیوتیکی فعالی را نشان دادند و لینوزولید و ونکومایسین آنتی‌بیوتیک‌های موثر در تمامی جدایه‌های

مورد بررسی بودند. نمونه های حاصل از تراشه بیش از ۵۰ درصد نمونه‌های ما را به خود اختصاص دادند. در مطالعه‌ای که توسط Revdiwala و همکارانش در سال ۲۰۱۲ روی عوامل اتیولوژیک ایجادکننده بیوفیلم در بخش مراقبت‌های ویژه در هند انجام شده اغلب باکتری‌ها از نمونه تراشه جدا شد(۳) که مشابه با مطالعه ما می‌باشد. این امر ممکن است به دلیل فراوانی بیش‌تر بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه باشد که با استفاده از ونتیلاتورهای مکانیکی (یا لوله‌گذاری) مورد پشتیبانی قرار گرفته‌اند. مطالعه روی توانایی اتصال و تشکیل بیوفیلم و ژن‌های دخیل در ایجاد بیوفیلم در جدایه‌های مختلف بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در خصوص درک بهتر روند پیچیده تشکیل بیوفیلم و عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم‌ها فراهم نماید(۲۰). گزارش‌های بسیاری در مورد ارتباط بین روش‌های فنوتیپی مانند میکروتیتر پلیت و حضور ژن‌های *ica* در*استافیلوکوکوس اورئوس*‌های جدا شده در نقاط مختلف جهان منتشر شده است(۲۱،۹،۷). در مطالعه‌ای که توسط افتخار و همکارانش در سال ۲۰۱۱، روی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین انجام شد، نشان دادند ۷۳ درصد جدایه‌های مورد بررسی واجد ژن‌های *icaAB* بودند. در این گزارش حدود ۷۰ درصد جدایه‌ها توانایی کم‌تری برای تشکیل بیوفیلم واجد ژن های *ica* داشتند(۲۱). در مطالعه‌ای که توسط نامور در سال ۲۰۱۳ روی ۶۰ جدایه بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام گرفت، نشان داده شد تمامی جدایه‌ها از نظر ژن *icaC* مثبت بودند، با این حال بررسی توانایی ایجاد بیوفیلم در این جدایه ها بسیار هتروژن به دست آمده است(۲۲). در مطالعات ذکر شده ژن‌های *icaAD* مورد بررسی قرار گرفته و نیز روش بررسی توانایی بیوفیلم، روش کشت روی محیط کنگو-رد آگار بوده است. بر خلاف مطالعات قبلی، در این مطالعه تمامی ژن‌های موجود در اپران *ica* مورد بررسی قرار گرفته است و نیز برای بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم از روش میکروتیتر پلیت استفاده گردید که در بسیاری از مطالعات از این روش به عنوان یکی از بهترین روش‌های بررسی توانایی اتصال یاد شده است. همان طور که ذکر شد، در ۲۰ جدایه (۲۷/۸ درصد) از *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های مورد بررسی تمامی ژن‌های *icaABCD* حضور داشتند، حال آن که در بین این جدایه‌ها ۱۱ (۵۵ درصد) سویه دارای توانایی تشکیل بیوفیلم قوی و ۹ جدایه (۴۵ درصد) دارای توانایی تشکیل بیوفیلم متوسط بودند. تفاوت بین خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی در جدایه‌های مورد بررسی ممکن است به عوامل دیگری از قبیل شرایط فیزیولوژیکی باکتری و هم چنین تفاوت در منشاء ژنتیکی باکتری‌ها بستگی داشته باشد؛ بنابراین، حضور یا عدم حضور یک ژن به تنهایی نمی‌تواند تعیین‌کننده توانایی تشکیل بیوفیلم در باکتری باشد. در مطالعه حاضر، بیش از ۲۰ جدایه مورد بررسی، واجد همه ژن‌های *ica* بودند با این حال این ایزوله‌ها از نظر توانایی تشکیل بیوفیلم در دو طیف قوی و متوسط قرار گرفتند ولی هیچ جدایه‌ای با عدم توانایی تشکیل بیوفیلم مشاهده نشد.

استافیلوکوکوس اورئوس، از جمله باکتری‌هایی است که در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی به خصوص در بخش مراقب‌های ویژه از اهمیت زیادی برخوردار است. این باکتری توانایی بالایی در تشکیل بیوفیلم دارد که این امر می‌تواند در پیدایش عفونت‌های مزمن و هم چنین ایجاد سویه‌های مقاوم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف اهمیت داشته باشد. ظهور سویه‌های مقاوم با توانایی تشکیل بیوفیلم در محیط بیمارستان می‌تواند یک خطر جدی برای بیماران محسوب شود؛ به خصوص اگر این بیماران دچار نقص ایمنی بوده و تحت درمان‌های تهاجمی از قبیل استفاده از ابزارهای مصنوعی مانند ونتیلاتور مکانیکی و غیره قرار گیرند. این پدیده می‌تواند باعث افزایش عوارض و مرگ و میر در محیط‌های بیمارستانی شود. از سوی دیگر، باکتری‌های موجود در بیوفیلم قادرند با استفاده از مکانیسم‌های

مختلف انتقال مقاومت دارویی، باعث گسترش مقاومت بین باکتری‌های مولد عفونت در بخش مراقبت‌های ویژه شوندکه خود این پدیده نیز می‌تواند یک تهدید جدی برای مراقبت از بیمارانی باشد که در شرایط بحرانی در موسسات بهداشتی و درمانی بستری هستند.

با توجه به اهمیت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در بخش‌های درمانی و توانایی این باکتری در ایجاد عفونت‌های متعدد به منظور پیشگیری از تشکیل بیوفیلم توسط این باکتری روی ابزارهای درمانی و پزشکی می‌توان به موارد زیر توجه کرد: ۱- پاک‌سازی و نظافت وسایل قبل از استریلیزاسیون، ۲- استفاده از دستکش، گان و شست و شوی دست قبل از تماس با بیمار، ۳- استفاده از کاترهای یک بار مصرف، ۴- استفاده از آب استریل برای شست و شوی تجهیزات، ۵- استفاده از کاترها و لوله‌های داخل تراشه آغشته به مواد آنتی‌سپتیک، ۶- بررسی پرسنل ازنظر حامل بودن *استافیلوکوکوس اورئوس* به خصوص در بخش مراقبت‌های ویژه و ۷- شناسایی منابع و راه‌های احتمالی انتقال عفونت می‌توانند در پیشگیری از تشکیل اولیه بیوفیلم موثر باشند.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر بخشی از رساله دکتری رشته باکتری‌شناسی پزشکی مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی آن دانشگاه انجام شده است.

References

1. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol 2008; 8(6): 747-763.
2. Afrough P, Pourmand MR, Zeinalinia N, Yousefi M, Abdossamadi Z, Yazdchi SB. Molecular Typing of Clinical and Nasal Carriage Isolates of Staphylococcus aureus by spa Gene Patterns. J Mazandaran Univ Med Sci 2012; 22(94): 28-34.
3. Revdiwala S, Rajdev BM, Mulla S. Characterization of bacterial etiologic agents of biofilm formation in medical devices in critical care setup. Crit Care Res Pract 2012; 2012: 945805.
4. Feldman C, Kassel M, Cantrell J, Kaka S, Morar R, Mahomed AG, et al. The presence and sequence of endotracheal tube colonization in patients undergoing mechanical ventilation. Eur Respir J 1999; 13(3): 546-551.
5. Stepanović S, Vuković D, Ježek P, Pavlović M, Švabic-Vlahović M. Influence of dynamic conditions on biofilm formation by staphylococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20(7): 502-504.
6. Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. Emerg Infect Dis 2001; 7(2): 277-281.
7. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in Staphylococcus aureus and is required for biofilm formation. Infect Immun 1999; 67(10): 5427-5433.
8. Chaieb K, Mahdouani K, Bakhrouf A. Detection of ica A and ica D loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by Staphylococcus epidermidis isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. J Hosp Infect 2005; 61(3): 225-230.
9. Atshan SS, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Lung LTT, Hamat RA, Karunanidhi A, et al. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of

Staphylococcus aureus. J BioMed Biotechnol 2012; 2012: 976972.

10. 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): 445-459.
11. Cucarella C, Tormo MÁ, Knecht E, Amorena B, Lasa Í, Foster TJ, et al. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of Staphylococcus aureus and alters the infective process. Infect Immun 2002; 70(6): 3180-3186.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-first informational supplement M100-S21. CLSI, Wayne, PA. 2011.
13. Vancraeynest D, Hermans K, Haesebrouck F. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence Staphylococcus aureus isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. Vet Microbiol 2004; 103(3-4): 241-247.
14. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999; 284(5418): 1318-1322.
15. DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated meticillin-resistant Staphylococcus aureus. The Lancet 2010; 375(9725): 1557-1568.
16. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin Microbiol Rev 2010; 23(3): 616-687.
17. Aligholi M, Emaneini M, Jabalameli F, Shahsavan S, Dabiri H, Sedaght H. Emergence of high-level vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in the Imam Khomeini Hospital in Tehran. Med Princ Pract 2008; 17(5): 432-434.
18. Azimian A, Havaei SA, Fazeli H, Naderi M, Ghazvini K, Samiee SM, et al. Genetic characterization of a vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolate from the respiratory tract of a patient in a university hospital in northeastern Iran. J Clin Microbiol 2012; 50(11): 3581-3585.
19. Stickler DJ. Bacterial biofilms and the encrustation of urethral catheters. Biofouling 1996; 9(4): 293-305.
20. Rohde H, Knobloch JK, Horstkotte MA, Mack D. Correlation of Staphylococcus aureus icaADBCgenotype and biofilm expression phenotype. J Clin Microbiol 2001; 39(12): 4595-4596.
21. Eftekhar F, Dadaei T. Biofilm Formation and Detection of IcaAB Genes in Clinical Isolates of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus. Iran J Basic Med Sci 2011; 14(2): 132-136.
22. Namvar AE, Asghari B, Ezzatifar F, Azizi G, Lari AR. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) in clinical Staphylococcus aureus isolates. GMS Hyg Infect Control 2013; 8(1): Doc03.