Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 9, Number 4 (02-2016)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Prevalence of ica operon related genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates

Fatemeh Shahkarami[1], Ahmad Rashki[2]

1. Department of Biology, Faculty of Basic Science, University of Zabol, Iran
2. Department of Physiopathology, Faculty of Vet-Medicine, University of Zabol, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2014/05/25
Accepted: 2015/10/13
Available online:2016/01/10

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 1394; 9(4): 16-23

Corresponding author at:
Ahmad Rashki

Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiopathology, University of Zabol, Zabol, Iran

Tel:
+98 915 1970877

Email:
ah_rashki@usal.es

Abstract

Background and Aim: Infections caused by Staphylococcus species associated with biofilm are considered as a serious clinical concern in medical devices used patients with serious clinical illness and are usually possible source of nosocomial infections. The polysaccharide adhesion mechanism encoded by the ica operon generate a direct role in biofilm formation and infection of the bacteria. In this study, the presence of ica operon were studied in clinical isolates of *S. aureus* and *S. epidermidis* in relation to the biofilm formation.

Materials and Methods: In this study, the 27 *S. aureus* isolates and 73 *S. epidermidis* isolates were identified by conventional biochemical methods. The ability to biofilm formation was evaluated by colony morphology on Congo red agar (CRA) and test tube. Presence of the ica genes was detected by PCR method.

Results: In this study, from 27 *S. aureus* isolates and 73 *S. epidermidis*, 25 (93%) and 70 (96%) isolates had the ability to form biofilms respectively. Genetic analysis showed that icaRADBC operon was present in 4 and 11% of *S. aureus* isolates and *S. epidermidis* isolates respectively. The *S. epidermidis* isolates were more frequently positive for *icaA*, *icaB* and *icaC* than *S. aureus* while the most prevalent gene was *icaD* found in 30% of the *S. aureus* isolates.

Conclusions: The results obtained showed that in consistent with other researches; biofilm formation in Staphylococcal isolates was not associated with present of ica operon and presumably depend on several factors.

Key Words: Biofilm, ica operon, Phenotype, Staphylococcus

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

Ar

How to cite this article:

Shahkarami F, Rashki S. Prevalence of ica operon related genes in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis clinical isolates. Iran J Med Microbiol. 2016; 9 (4) :16-23

www.SID.ir

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران
سال ۹ – شماره ۴ – زمستان ۱۳۹۴
Journal homepage: www.ijmm.ir

فراوانی ژن های اپرون ica در جدایه های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*

فاطمه شاهکرمی[۱]، احمد راشکی[۲]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، ایران.
۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۰۴
پذیرش: ۱۳۹۳/۰۷/۲۰
انتشار آنلاین: ۱۳۹۳/۱۰/۲۰
موضوع:
باکتری شناسی پزشکی
IJMM 1394; 9(4): 16-23

نویسنده مسئول:
دکتر احمد راشکی
زابل- دانشگاه زابل- دانشکده دامپزشکی.
تلفن: ۰۹۱۵۱۹۷۰۸۷۷
پست الکترونیک:
ah_rashki@usal.es

چکیده

زمینه و هدف: عفونت های ناشی از گونه های استافیلوکوکوس مرتبط با بیوفیلم همچنان به عنوان یک نگرانی بالینی جدی در بیماران استفاده کننده از ابزارهای پزشکی مطرح بوده و به عنوان منبعی برای ایجاد عفونت های بیمارستانی محسوب می گردند. ژن های مربوط به اپرون ica پلی ساکاریدهای چسبنده بین سلولی را تولید می کنند که مستقیما در تشکیل بیوفیلم وعفونت زایی این باکتری نقش اصلی را دارد. در این مطالعه به بررسی میزان حضور ژن های اپرون ica مرتبط با بیوفیلم و بررسی توانایی اتصال و پتانسیل تولید بیوفیلم در ایزوله های بالینی ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* پرداخته شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تعداد۲۷ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* و ۷۳ ایزوله *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با روش های بیوشیمیایی معمول تعیین هویت شدند. توانایی تشکیل بیوفیلم با استفاده از دو روش کنگورد و لوله ای بررسی شد. سپس با استفاده از روش PCR حضور ژن های اپرون ica در تمام ایزوله ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: در این بررسی ازتعداد ۲۷ و ۷۳ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به ترتیب ۲۵ و ۷۰ ایزوله توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند. آنالیز ژنتیکی نشان داد که اپرون icaADBC به ترتیب در ۴٪ و ۱۱٪ ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اپیدرمیدیس* یافت شدند. میزان فراوانی *icaB* ، *icaA* و *icaC* در *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بیشتر از *استافیلوکوکوس اورئوس* بود در حالیکه ژن *icaD* در ۳۰٪ ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان داد که مطابق با مطالعات دیگر؛ تشکیل بیوفیلم در ایزوله استافیلوکوکی با حضور اپران ica همراه نیست و احتمالا به عوامل متعددی بستگی دارد.

کلمات کلیدی: بیوفیلم، اپرون ica، فنوتیپ، استافیلوکوکوس

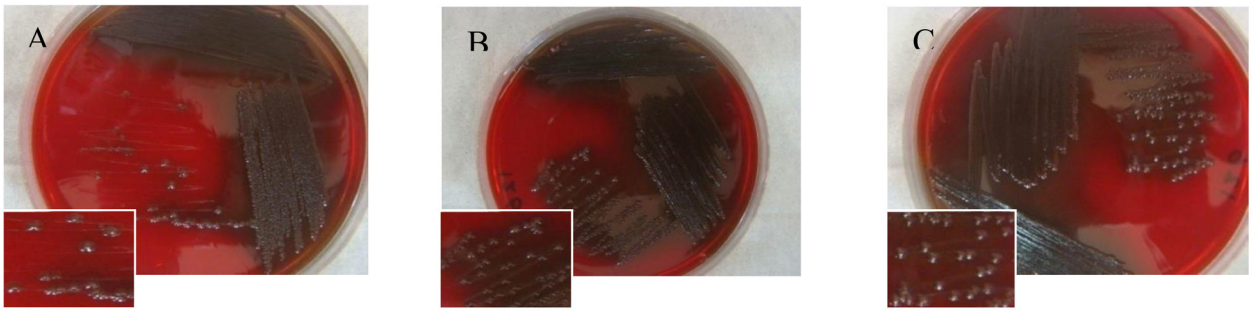
کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

گونه های جنس استافیلوکوک یکی از شایع ترین عوامل بروز عفونت های بیمارستانی در دنیا می باشند (۱, ۲). بروز عفونت های استافیلوکوکسی درسال‌های اخیر به دلیل انتشارسویه های مقاوم، افزایش بیماران با ضعف ایمنی و استفاده بیش از حد از وسایل پزشکی مانند کاتتر رو به افزایش است (۳) .در میان گونه های استافیلوکوکسی، *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای بیشترین توانایی بیماریزایی است. *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بعنوان یکی از علل عفونت های بیمارستانی، بخش مهمی از فلور باکتریایی نرمال در پوست و غشاهای موکوزی را تشکیل می دهد (۴) .یکی از مکانیسم های اصلی توسعه عفونت های بیمارستانی توانایی تشکیل بیوفیلم است که باعث تسهیل چسبندگی باکتریایی به سطوح مختلف دستگاه ها پزشکی، می شود.

توانایی تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح وسایل پزشکی از جمله کاتترها و دریچه مصنوعی قلب در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اپیدرمیدیس* متفاوت است (۶، ۵). ژن های کنترل کننده تولید slime در *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می تواند در تشکیل بیوفیلم دخیل باشد(۷). ژن هایی که مهمترین مواد تشکیل دهنده بیوفیلم(پروتئین هاو پلی ساکارید چسبنده) را کد می کنند متعلق به اپرون ica می باشند. این اپرون

www.SID.ir



تصویر شماره‌ی ۳: تشکیل بیوفیلم به روش کنگورد: A: بیوفیلم ضعیف- B: بیوفیلم متوسط- C: بیوفیلم قوی

شامل ژن های icaABCD و ژن تنظیم کننده *icaR* است که از رونویسی اپرون ica جلوگیری می کند. نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده روی مراحل تشکیل بیوفیلم نشان می دهد که تجمع سلولی، انباشت بیوفّیلم و سنتز کپسول پلی ساکارید(PIA) به واسطه اپرون ica انجام می شود (۸-۱۱). Los و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش کردند که بعضی استافیلوکوکوس های حاوی اپرون ica توانایی تولید بیوفیلم را نداشتند (۱۲).

بیوفیلم به عنوان مهمترین عامل در بیماری های انسانی و عفونت ها شناخته می شوند (۴). به نظر می رسد تعداد بیماری های مرتبط با بیوفیلم رو به افزایش است. شناخت ویژگی های رشد بیوفیلم و جنبه های مختلف تشکیل بیوفیلم برای درمان موفقیت آمیز عفونت مهم است. استفاده از روش های آزمایشگاهی رایج مانند لوله ای، کنگورد و پلیت، همراه با استفاده از روش PCR برای تشخیص توانایی تشکیل بیوفیلم در باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اپیدرمیدیس* از اهمیت به سزایی برخوردار است. هدف از انجام این مطالعه، تعیین فراوانی ژن های تشکیل دهنده اپرون ica و ارتباط آن با تشکیل بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اپیدرمیدیس* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان های آموزشی زابل بود.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها

این مطالعه توصیفی بر روی ۲۵۰ نمونه گرفته شده از نمونه های کلینیکی بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های شهرستان زابل در فاصله زمانی فروردین ۱۳۹۱ تا شهریور۱۳۹۱ انجام پذیرفت. نمونه های جمع آوری شده به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه زابل منتقل شده و ابتدا روی محیط های آگار خونی، مانیتول سالت آگار دردمای ۳۷ ºC به مدت ۱۸-۲۴ ساعت گرما گذاری شدند.

کلنی های رشد کرده روی محیط مانیتول سالت آگار با انجام تست های بیوشیمیایی نظیر کاتالاز، کوآگولاز، اوره از، DNase، حساسیت به نوبیوسین و باسیتراسین تعیین هویت گردید.

آزمون تشخیص بیوفیلم

روش لوله ای(TM)

یکی از روش های کیفی تشخیص بیوفیلم روش لوله ای است. در این روش یک لوپ پر از میکروارگانیسم در ۱۰ میلی لیتر محیط (TSB: Trypticase Soy Broth)کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ ºC گرماگذاری شد. پس از ۲۴ ساعت محتویات داخل لوله ها را دور ریخته و لوله ها با (PBS :1X phosphate buffer saline) شستشو داده ودرمحیط آزمایشگاه خشک شد. پس از خشک شدن لوله ها آنها را با کریستال ویوله ۱٪ به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی گردید.

روش کنگو رد(CRA)

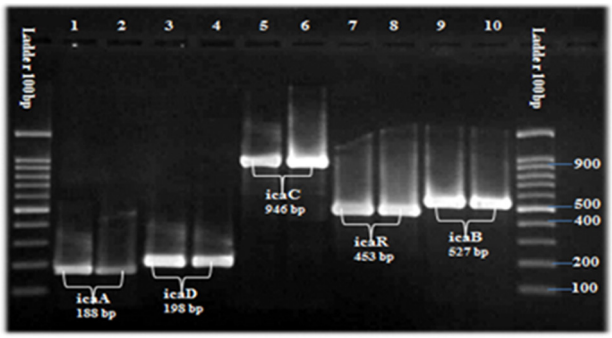
در این روش باکتری ها روی محیط جامد BHI حاوی ۰/۸ درصد رنگ کنگورد کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرماگذاری گردید. سپس تشکیل بیوفیلم بر روی پلیت مورد بررسی قرار گرفت(۱۳).

استخراج DNA ژنومی

ابتدا استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش فنل- کلروفرم به شرح ذیل انجام شد(۱۴). ابتدا یک کلنی از ایزوله های تعیین هویت شده در ۵ میلی لیتر محیط مایع (Brain Heart Infusion) به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در گرم خانه شیکردار کشت داده شد. جدا سازی باکتری ها ار محیط مایع با استفاده ازسانتریفیوژ با دور۴۸۰۰ در دقیقه به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت و سپس به رسوب حاصله ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE اضافه گردید. سپس به سوسپانسیون حاصله (جهت لیز سلولی و آزاد کردن محتویات آن) مقدر ۰/۱ حجم محلول، SDS ۱۰٪ افزوده گردید و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۵۶ ºC گرما گذاری شد. فنل اشباع و کلروفرم به نسبت مساوی و به اندازه حجم سوسپانسیون به لوله ها اضافه شد و مدت ۵ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ به آرامی به لوله جدید منتقل گردید و هم حجم آن کلروفرم اضافه شد. لوله ها به مدت ۱۵

Archive of SID

www.SID.ir



تصویر شماره‌ی ۱: نمونه ای از تکثیر ژن های اپرون *icaA* را نشان می‌دهد. چاهک ۱و۲ ژن *ica* با ۱۸۸ جفت باز چاهک ۳و۴ ژن*icaD* با ۱۹۸ جفت باز چاهک ۵و۶ ژن *icaC* با ۹۴۶ جفت باز چاهک ۷و۸ ژن *icaR* با ۴۵۳ جفت باز و چاهک ۹و۱۰ ژن *icaB* با ۵۲۷ جفت باز

ثانیه به آرامی تکان داده شد و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ گردید. فاز رویی دوباره به لوله جدید منتقل شد و ۰/۱ حجم محلول، استات سدیم M ۳ اضافه گردید. سپس ۲-۲/۵ برابر حجم آن، اتانول مطلق سرد اضافه گردید. لوله ها به آرامی بین انگشتان دست به مدت ۱۰ ثانیه را تکان داده شد وبه مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰- °C قرار گرفت. سپس لوله ها به مدت ۱۵دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه در دمای ۴ °C ساتنریفیوژ شد. رسوب حاصله با ۵۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۰٪ شستشو داده شد. در پایان، رسوب DNA خشک شده با ۱۰۰ میکرولیتر بافر TEحل و در دمای ۲۰- °C نگهداری شد. جهت تایید غلظت مناسب DNA استخراجی،تمامی نمونه ها توسط دستگاه نانودراپ

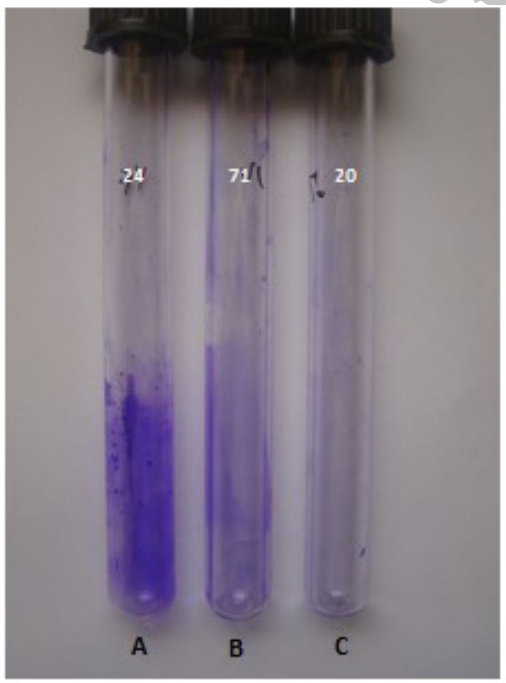
جدول۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

ژن	اندازه قطعه(bp)	توالی پرایمر(´۵ به ´۳)	منبع
icaA	188 bp	F ACACTTGCTGGCGCAGTCAA R TCTGGAACCAACATCCAACA	این مطالعه
icaD	198 bp	F ATGGTCAAG CCCAGACAGAG R AGT ATT TTCGTTTAAAGC AA	این مطالعه
icaB	527 bp	F ATGGCTTAAAGCACACGACGC R TATCGG CATCTGGTGTGACAG	این مطالعه
icaC	936 bp	F ATCATCGTGACACACTTACTAACG R CTCTCTTAACATCATTCCGACGCC	این مطالعه
icaR	453 bp	F TACTGTCCTCAATAATCCCGAA R GGTACGATGGTACTACACTTGATG	این مطالعه

در نسبت A۲۶۰ به A۲۸۰ اندازه گیری شد.

فراوانی ژن های اپرون ica

برای شناسایی ژن های اپرون ica در ایزوله های *استافیلوکوکوس* جدا شده از تکنیک PCR استفاده شد (۱۶, ۱۵). توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه در جدول ۱ آمده است. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف انجام گردید. جهت انجام PCR آنزیم ۲×MasterMix Red از شرکت آمیکون کشور دانمارک خریداری گردید. در این واکنش، دو میکرولیتر از DNA الگو، ۱۲/۵ میکرولیتر از آنزیم ۲×MasterMix Red و ۱ میکرولیتر(۱۰ پیکو مول) از هر پرایمر را با هم مخلوط و حجم نهایی آن با آب مقطر دو بار تقطیر به ۲۵ میکرو لیتر رسانده شد. برنامه اجرایی سیکل های PCR واجد مراحل زیر بود. واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل حرارتی شامل: واسرشتگی در دمای ۹۴ °C به مدت۱دقیقه، اتصال پرایمر به DNA الگو برای ژن *icaA* (۵۸ °C به مدت۱ دقیقه)، برای ژن *icaD* (۵۶ °C به مدت ۱دقیقه) ، بـــرای ژن های *icaC* و *icaB* ۶۰ °C به مدت ۱ دقیقه و برای ژن *icaR* ۵۹ °C به مدت ۱ دقیقه و طویل شدن رشته الگو تکثیر در۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و در پایان



تصویر شماره‌ی ۲: تشکیل بیوفیلم به روش لوله ای- A: بیوفیلم قوی- B: بیوفیلم متوسط- C: بیوفیلم منفی

www.SID.ir

جدول۱: تعداد و درصد ژن های اپرون ica در ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* تشکیل دهنده بیوفیلم

میکروارگانیسم	توانایی تشکیل بیوفیلم	وجود اپرون ica											
	CRA^+	TM^+	icaA	icaC	icaD	icaR	اپرون ica						
استافیلوکوکوس اورئوس (۲۷)	25	23	6	4	8	3	3						
	93%	85%	22%	15%	30%	11%	11%						
	CRA^+	TM^+	CRA^+	TM^+	CRA^+	TM^+	CRA^+	TM^+	CRA^+	TM^+	CRA^+	TM^+	
	5	-	3	1	4	-	8	1	3	1	8	3	
P-value	1.0000	0.4965	1.0000	1.0000	0.6144	1.0000	0.1147	1.0000	0.6144	1.0000	0.0279	1.0000	0.2396
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (۷۳)	70	48	11	11	8	8	3						
	96%	66%	15%	15%	11%	11%	4%						
	CRA^+	TM^+	CRA^+	TM^+	CRA^+	TM^+	CRA^+	TM^+	CRA^+	TM^+	CRA^+	TM^+	
	10	5	10	8	5	8	3	8	4	3	8	3	
P-value	1.0000	0.4965	1.0000	1.0000	0.7794	0.8020	0.1595	1.0000	0.7616	1.0000	0.5234	1.0000	1.0000

دمای طویل شدن نهایی در $72\ ^oC$ به مدت ۷ دقیقه انجام شد. پس از انجام PCR، ۵ میکرولیتر از محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۲٪ به مدت ۸۰ دقیقه تحت تاثیر ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شد. قطعات تکثیر شده پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با دستگاه (GelDocumentation UVITEC,Cambridge) مشاهده شد. همچنین از مارکر bp ۱۰۰ برای تایید وزن مولکولی محصولات PCR استفاده گردید (تصویر۱). در پایان نتایج با استفاده از آزمون فیشر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها

جهت انجام تست های فنوتیپی از دو روش TM و CRA استفاده گردید. در روش TM بعد از رنگ آمیزی لوله ها دو بار با آب مقطر دوبار یونیزه شستشو داده شدند. تشکیل بیوفیلم به صورت یک لایه رنگ گرفته بر روی سطح داخلی دیواره لوله مشاهده شد که میزان تشکیل آن به صورت(+، ++، +++) در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از تولید کمی بیوفیلم به روش TM در جدول ۲ و تصویر ۲ نشان داده شده است.

در روش CRA بعد از کشت ایزوله های باکتریایی بر روی محیط کنگو رد کلنی های صورتی بیوفیلم منفی، کلونی های صورتی بر روی زمینه محیط سیاه بیوفیلم + ، کلونی های سیاه بر روی زمینه محیط صورتی بیوفیلم ++ و کلونی های سیاه بر روی زمینه محیط سیاه بیوفیلم +++ ارزیابی گردید. تولید کیفی به روش CRA در جدول ۳ و تصویر۳ نشان داده شده است.

در روش TM از ۲۷ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۳ ایزوله (۸۵٪) مثبت و ۴ ایزوله (۱۵٪) منفی و از ۷۳ ایزوله *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ۴۸ ایزوله(۶۶٪) مثبت و ۲۵ ایزوله (۳۴٪) منفی ارزیابی شدند. در مجموع از ۱۰۰ ایزوله مورد مطالعه ۷۱٪ مثبت و ۲۹٪ منفی بودند.

در روش CRA از ۲۷ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۵ ایزوله (۹۳٪) مثبت و ۲ ایزوله (۷٪) منفی و از ۷۳ ایزوله *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ۷۰ ایزوله (۹۶٪) مثبت و ۳ ایزوله (۴٪) منفی ارزیابی شدند. در مجموع از ۱۰۰ ایزوله ۹۵٪ مثبت و ۵٪ منفی بودند (جدول ۲).

نتایج بدست آمده از بررسی میزان فراوانی ژن های اپرون ica نشان می دهد که از ۲۷ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* بالاترین فراوانی مربوط به ژن *icaD* (۳۰٪) بوده و ژن های *icaA* (۲۲٪) ، *icaB* ۱۱٪، *icaC* ۱۵٪ و *icaR* ۱۱٪ به ترتیب در مرتبه های بعدی قرار دارند. از میان ۷۳ *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جدا شده از نمونه های کلینیکی ۱۱٪، ۱۴٪،۱۵٪،۱۵٪ و۱۱٪ به ترتیب حاوی ژن های *icaC*، *icaA*، *icaB*، *icaD* و *icaR* بودند. از مجموع ۱۰۰ ایزوله جدا شده (۲۷ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* و ۷۳ *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*) توزیع فراوانی ژن های مورد مطالعه به صورت *icaR* ۱۱٪، *icaC* ۱۲٪، *icaB* ۱۴٪، *icaD* ۱۹٪، و *icaA* ۱۶٪ مشاهده شد (جدول۲).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که میزان فراوانی ژن های اپرون ica با نتایج فنوتیپی تشکیل بیوفیلم همخوانی معنی داری نداشت (جدول۲). همچنین icaAD+ و icaDBCR+ به

www.SID.ir

ترتیب در۸٪ و ۹٪ ایزوله ها مشاهده شد.

بحث

توانایی چسبیدن و تشکیل بیوفیلم روی مخاط و وسایل پزشکی یکی از فاکتور های اصلی ویرولانس در گونه های استافیلوکوکی می باشد. بیوفیلم باعث می شود تا باکتری در برابر عواملی چون حضور آنتی بیوتیک ها ، استرس های محیطی ، عوامل فاگوسیت کننده و پاسخ ایمنی میزبان مقاومت کند. مطالعه توانایی تشکیل بیوفیلم و مشخص کردن ژن های دخیل در آن در ایزوله های مختلف استافیلوکوکی ممکن است به فهم بهتر فرایند تشکیل بیوفیلم و به دنبال آن عفونت کمک کند. امروزه برای سنجش توانایی تشکیل بیوفیلم، از تعیین میزان حضور ژن های اپرون ica و تست کیفی کنگورد آگار ، تست کمّی TCP و روش پلیت استفاده می شود. در مطالعه حاضر تولید بیوفیلم به دو روش (لوله ای و کنگورد آگار) با شدتهای مختلف مشاهده شد. پژوهش حاضر نشان داد که از بین ۲۷ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۲٪ دارای *icaA*، و۳۰٪ دارای *icaD*، ۱۱٪ دارای icaB، ۱۵٪ دارای *icaC* و ۱۱٪ دارای *icaR* بودند. از مجموعه ۷۳ *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جدا شده، ۱۴٪، ۱۵٪، ۱۵٪، ۱۱٪ و ۱۱٪ به ترتیب حاوی ژن های *icaC*، *icaD*، *icaA* و *icaR* بودند. نتایج حاصل از تولید بیوفیلم به دو روش (لوله ای و کنگورد آگارد) نشان می دهد که حدود ۷۰٪ *استافیلوکوکوس اورئوس* و ۸۵٪ *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* تشکیل دهنده بیوفیلم فاقد اوپرون ica بودند که ممکن است عوامل دیگری غیر از اپرون ica از جمله محیط(۱۷)، حضورگلوکز(۱۸)، pH، شرایط بافتهای بدن میزبان، وجود یا عدم وجود ژن *aap*، پراکسید هیدروژن(۱۹) و تولید بیوفیلم از طریق مکانیسمهای مستقل از PIA (۲۰) در بروز تفاوت بین نتایج فنوتیپی و ژنوتیپی در تشکیل بیوفیلم دخالت داشته باشد. Cramiton و همکاران در مطالعه خود گزارش کردند که عدم تشکیل بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس* ممکن است در نتیجه حذف اپرون ica باشد (۲۱). بر طبق یافته های suzuki و همکاران حتی محل آناتومیک و محیط فیزیولوژیکی که از آن نمونه ها جدا شده است ممکن است در تشکیل بیوفیلم تاثیرگذار باشد به طوریکه فراوانی اپرون ica در ایزوله های جدا شده از کیسه ملتحمه ۶۰٪ و در ایزوله های جدا شده از پوست ۱۵٪ گزارش شده است(۲۲).

یافته های Liduma و همکاران نشان داد در تشکیل بیوفیلم ژن های *icaA* و*aap* نقش مهمی بازی می کنند، اما وجود این دو برای تشکیل بیوفیلم کافی نیست. بطوریکه در سویه های *icaA+/aap+* بیوفیلم منفی مشاهده شد(۲۳).در یافته های مطالعه حاضر همه ایزوله های icaABCDR + دارای بیوفیلم مثبت ارزیابی شدند فقط ۱ ایزوله *icaA+* با بیوفیلم منفی مشاهده شد که مطابق با یافته های *Frebourg* و همکاران شاید نتیجه تاثیرات عوامل محیطی مثل غلظت آنتی بیوتیک در بدن بیمار هنگام نمونه برداری، درجه حرارت بالا، حضور قند و غیره باشد (۲۴).

به طور خلاصه مطالعه حاضر فراوانی پایین حضور ژن های اوپرون ica را در بین دو گونه مورد مطالعه تشکیل دهنده بیوفیلم نشان داد. با توجه به نتایج این مطالعه پیشنهاد می شود که تشکیل بیوفیلم درگونه های استافیلوکوکی ممکن است چندعاملی باشد و عمیقا تحت تاثیر محیط قرار میگیرد. در حالی که حضور اپرون ica در تولید بیوفیلم ممکن است دارای اهمیت باشد، اما نقش سایر عوامل و همکاری آنها هنوز به طور کامل روشن نشده است. از آنجا که تنوع ژنتیکی بالایی در بین جدایه استافیلوکوکی جمع آوری شده از نمونه های بالینی دیده می شود، پیشنهاد می گرددکه مشابه تحقیق حاضر بر روی گونه های استافیلوکوکی شناخته شده آزمایشگاهی انجام گیرد. بنابر این روش استفاده از یافته های ژنتیکی برای تشخیص توانایی تشکیل بیوفیلم در بین ایزوله های استافیلوکوکی مناسب نیست.

تقدیر و تشکر

این پژوهش بخشی از پایان نامه فاطمه شاهکرمی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه زابل می باشد. بدینوسیله از اساتید و کارکنان دانشکده دامپزشکی و گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه زابل که امکانات لازم را جهت انجام این پژوهش فراهم نمودند سپاسگزاری می شود.

Reference

1. Kilic A, Basustaoglu AC. Double triplex real-time PCR assay for simultaneous detection of Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus hominis, and Staphylococcus haemolyticus and determination of their methicillin resistance directly from positive blood culture bottles. Res Microbiol. 2011;162(10):1060-6.

2. Jadhav S, Hussain A, Devi S, Kumar A, Parveen S, Gandham N, et al. Virulence characteristics and genetic affinities of multiple drug resistant uropathogenic Escherichia coli from a semi urban locality in India. PLoS One. 2011;6(3):e18063.

3. Liu W, Vives-Bauza C, Acin-Perez R, Yamamoto A, Tan Y, Li Y, et al. PINK1 defect causes mitochondrial dysfunction, proteasomal deficit and alpha-synuclein aggregation in cell culture models of Parkinson's disease. PLoS One. 2009;4(2):e4597.

Archive of SID
www.SID.ir

4. El Farran CA, Sekar A, Balakrishnan A, Shanmugam S, Arumugam P, Gopalswamy J. Prevalence of biofilm-producing Staphylococcus epidermidis in the healthy skin of individuals in Tamil Nadu, India. Indian J Med Microbiol. 2013;31(1):19-23.

5. Eftekhar F, Speert DP. Biofilm formation by persistent and non-persistent isolates of Staphylococcus epidermidis from a neonatal intensive care unit. J Hosp Infect. 2009;71(2):112-6.

6. Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Campanile F, Amicosante G, Perilli MG, et al. Presence of the ica operon in clinical isolates of Staphylococcus epidermidis and its role in biofilm production. Clin Microbiol Infect. 2004;10(12):1081-8.

7. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Rizzi S, Donati ME, Baldassarri L, et al. Search for the insertion element IS256 within the ica locus of Staphylococcus epidermidis clinical isolates collected from biomaterial-associated infections. Biomaterials. 2004;25(18):4117-25.

8. Chokr A, Watier D, Eleaume H, Pangon B, Ghnassia JC, Mack D, et al. Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. Int J Med Microbiol. 2006;296(6):381-8.

9. McKenney D, Hubner J, Muller E, Wang Y, Goldmann DA, Pier GB. The ica locus of Staphylococcus epidermidis encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. Infect Immun. 1998;66(10):4711-20.

10. Conlon KM, Humphreys H, O'Gara JP. icaR encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of ica operon expression and biofilm formation in Staphylococcus epidermidis. J Bacteriol. 2002;184(16):4400-8.

11. Conlon KM, Humphreys H, O'Gara JP. Regulation of icaR gene expression in Staphylococcus epidermidis. FEMS Microbiol Lett. 2002 5;216(2):171-7.

12. Los R, Sawicki R, Juda M, Stankevic M, Rybojad P, Sawicki M, et al. A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of Staphylococcus epidermidis. FEMS Microbiol Lett. 2010 1;310(2):97-103.

13. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol. 1989;42(8):872-4.

14. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 2001.

15. Solati SM, Tajbakhsh E, Khamesipour F, Gugnani HC. Prevalence of virulence genes of biofilm producing strains of Staphylococcus epidermidis isolated from clinical samples in Iran. AMB Express. ;5(1):134.

16. Casagrande Proietti P, Stefanetti V, Hyatt DR, Marenzoni ML, Capomaccio S, Coletti M, et al. Phenotypic and genotypic characterization of canine pyoderma isolates of Staphylococcus pseudintermedius for biofilm formation. J Vet Med Sci. 31;77(8):945-51.

17. Atshan SS, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Lung LT, Hamat RA, Karunanidhi A, et al. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of Staphylococcus aureus. J Biomed Biotechnol.2012:976972.

18. Rodrigues AL, Pereira MA, Janknecht P, Brito AG, Nogueira R. Biofilms formed on humic substances: response to flow conditions and carbon concentrations. Bioresour Technol. 2010;101(18):6888-94.

19. Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Mahdouani K, Bakhrouf A. A microtiter plate assay for Staphylococcus aureus biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. New Microbiol. 2010;33(2):137-45.

20. Stevens NT, Tharmabala M, Dillane T, Greene CM, O'Gara JP, Humphreys H. Biofilm and the role of the ica operon and aap in Staphylococcus epidermidis isolates causing neurosurgical meningitis. Clin Microbiol Infect. 2008;14(7):719-22.

21. Cramiton SE, Gerke C, Gotz F. In vitro methods to study staphylococcal biofilm formation. Methods Enzymol. 2001;336:239-55.

Archive of SID

www.SID.ir

22. Suzuki T, Kawamura Y, Uno T, Ohashi Y, Ezaki T. Prevalence of Staphylococcus epidermidis strains with biofilm-forming ability in isolates from conjunctiva and facial skin. Am J Ophthalmol. 2005;140(5):844-50.

23. Liduma I, Tracevska T, Bers U, Zilevica A. Phenotypic and genetic analysis of biofilm formation by Staphylococcus epidermidis. Medicina (Kaunas). 2012;48(6):305-9.

24. Frebourg NB, Lefebvre S, Baert S, Lemeland JF. PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating Staphylococcus epidermidis strains. J Clin Microbiol. 2000;38(2):877-80.

Archive of SID

www.SID.ir