Archive of SID

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

عاطفه کریمی، فاتح رحیمی

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

***نشانی برای مکاتبه:** اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده دانشکده علوم و فناوری های زیستی، بخش میکروبیولوژی، دریافت مقاله: تیر نود و هشت پذیرش برای چاپ: شهریور نود و هشت

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس باعث ایجاد طیف گسترده ای از عفونتها در انسان از قبیل عفونت دستگاه ادراری می شود که ناشی از توانایی این باکتری در تشکیل بیوفیلم در نقاط مختلف دستگاه ادراری است. این مطالعه با هدف تعیین فنوتایپی و ژنوتایپی تشکیل بیوفیلم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در اصفهان انجام گرفته است.*

روش کار: *در طی سال ۱۳۹۵، در مجموع ۹۶ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از یک بیمارستان مرجع در اصفهان جمع آوری شدند و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تا حد گونه شناسایی گردیدند. به منظور بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم در میان سویه ها از روشهای کیفی و کمی فنوتایپی ژلوز قرمز کنگو و میکروتیتر پلیت استفاده گردید و حضور ژنهای مختلف مؤثر بر تشکیل بیوفیلم در میان سویه ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تعیین گردید.*

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

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

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

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از بیماری زاهای فرصت طلب است که می تواند سبب بروز بیماریهای خفیف و همچنین شدید در انسان گردد. این باکتری یکی از علل مهم عفونتهای مرتبط با دستگاههای پزشکی مانند سوندهای ادراری، کاتترهای عروقی و پروتز محسوب می شود. توانایی تشکیل بیوفیلم توسط استافیلوکوکوس اورئوس بر روی این دستگاهها می تواند منجر به عفونتهای مقاوم نسبت به درمانهای آنتی بیوتیکی گردد(۱). از جمله این عفونتها می توان به عفونتهای دستگاه ادراری اشاره کرد که از جمله رایجترین عفونتهای باکتریایی به شمار می‌روند و سالانه ۱۵۰ میلیون نفر را در سراسر جهان مبتلا می کنند(۲). عفونتهای دستگاه ادراری به دو دسته پیچیده و غیرپیچیده طبقه‌بندی می شوند. نوع غیرپیچیده (بدون عوارض)، افراد سالم (کسانی که هیچگونه اختلال ساختاری یا عصبی در مجاری ادراری ندارند) را درگیر می کند. این عفونتها به التهاب مثانه و التهاب کلیه تقسیم می شوند. نوع پیچیده مرتبط با عواملی است که مجاری ادراری و یا دفاع میزبان را

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

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

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

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

روش کار

در طی خرداد ماه تا دی ماه سال ۱۳۹۵ در مجموع ۹۶ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری از آزمایشگاه یک بیمارستان مرجع در شهر اصفهان جمع آوری شدند. جدایه ها پس از انتقال به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه اصفهان، بر روی محیط ژلوز مغذی (Biolife, Italy) کشت داده شدند و به منظور شناسایی و تأیید جدایه ها که در آزمایشگاه بیمارستان به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد شناسایی قرار گرفته بودند، از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی nucA استفاده گردید(۱۳). جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شده جهت انجام بررسیهای بیشتر در ویالهای کرایو واجد محیط مغذی و گلیسرول در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

به منظور بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم در میان سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به روش کیفی از آزمون ژلوز قرمز کنگو استفاده شد. برای این منظور، باکتریها بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو کشت داده شدند و سپس پلیتها به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در گرم‌خانه گذاشته

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

به منظور استخراج DNA، از روش جوشاندن استفاده شد. مطابق با دستورالعمل رحیمی و همکاران(۱۵) ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، در میکروتیوبهای استریل اضافه شد. سپس چند کلنی از کشت تازه باکتری به آب مقطر استریل اضافه و به خوبی ورتکس گردید. میکروتیوبهای حاوی باکتری به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شده و پس از آن، به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ × g سانتریفیوژ شدند و ۱۰ میکرولیتر از محلول رویی موجود در میکروتیوب، به عنوان DNA الگو در فرآیند PCR استفاده شد.

شناسایی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به کمک آزمون PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی nuc که رمزکننده آنزیم ترمونوکلئاز است، انجام شد. جهت انجام این آزمون از جفت پرایمرهای طراحی شده و برنامه ارائه شده توسط Zouharova و همکاران استفاده گردید(۱۶).

پس از بررسی فنوتایپی تشکیل بیوفیلم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس، به منظور تعیین وجود ژنهای icaA و icaD از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، مخلوط واکنش و چرخه حرارتی مطابق با دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده شد(۱۴).

جهت بررسی حضور ژنهای cna، fnbA و clfA از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، مخلوط واکنش و چرخه حرارتی منطبق بر پروتکل منتشر شده توسط قاسمیان و همکاران استفاده گردید(۱۷).

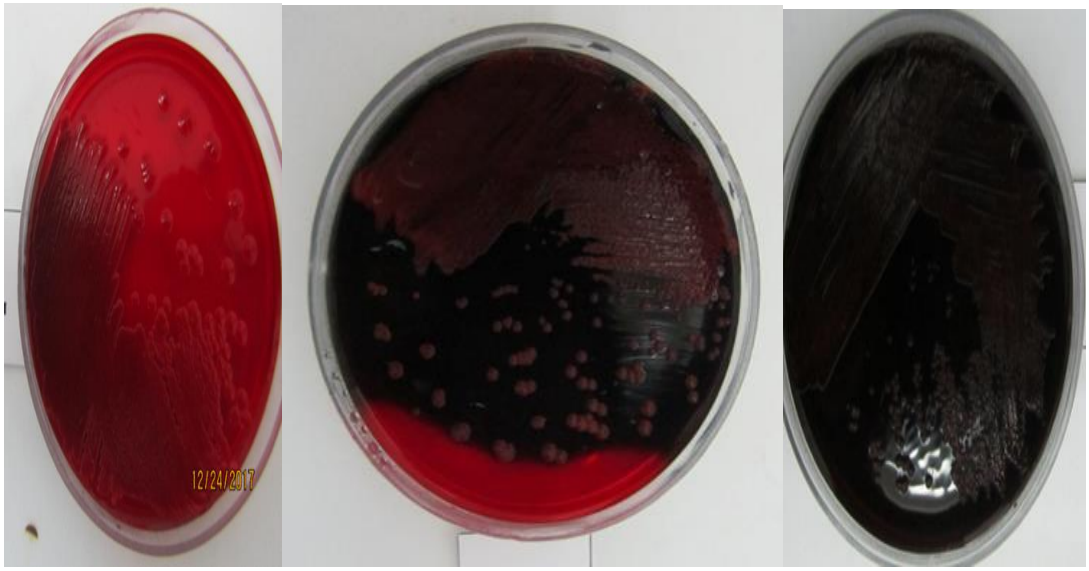
یافته ها

در این مطالعه جهت شناسایی ۹۶ جدایه که در آزمایشگاه بیمارستان مورد نظر به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس تشخیص داده شده بودند از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی nucA استفاده گردید. با آزمون PCR مشخص شد که تمامی ۹۶ جدایه مورد بررسی که از بیماران مبتلا به عفونت ادراری جدا شده بودند، سویه های استافیلوکوکوس اورئوس هستند.

براساس نتایج حاصل از آزمون ژلوز قرمز کنگو، از مجموع ۹۶ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی در این مطالعه، ۵ سویه (۵ درصد) واجد کلنیهای سیاه رنگ (سویه‌های مولد اسلایم و بیوفیلم مثبت)، ۶۹ سویه (۷۲ درصد) واجد کلنیهای قرمز تیره (سویه‌های اسلایم کاذب و بیوفیلم مشکوک) و ۲۲ سویه (۲۳ درصد) واجد کلنیهای قرمز روشن (سویه‌های اسلایم منفی و بیوفیلم منفی) بودند(شکل ۱).

www.SID.ir

Archive of SID



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

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

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

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

در مطالعه رحیمی و همکاران، در سال ۲۰۱۶ که بر روی سویه های جدا شده از عفونت ادراری در طی ۳ سال در شهر تهران انجام گرفت، ۹۴ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین به کمک آزمون ژلوز قرمز کنگو، بیوفیلم مثبت گزارش شدند. همچنین، با استفاده از روش میکروتیترپلیت، ۱۵ درصد سویه ها بیوفیلم قوی، ۶۲ درصد بیوفیلم متوسط و ۲۳ درصد بیوفیلم ضعیف و منفی بودند (۱۴). در مطالعه یوسفی و همکاران در سال ۲۰۱۶، فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس بیوفیلم مثبت جدا شده از عفونت ادراری ۶۹/۲ درصد بود (۱۸). در مطالعه Ando و همکاران، در سال ۲۰۰۴ که بر روی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از افردا مبتلا به عفونت ادراری انجام گرفت، ۹/۲ درصد بیوفیلم قوی و ۲۸/۴ درصد بیوفیلم متوسط بودند (۱۹). Khan و همکاران در سال ۲۰۱۱، فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مولد بیوفیلم قوی، متوسط و منفی را به ترتیب ۱۴/۵۱ درصد، ۵۰/۳۸ درصد و ۳۵/۱۱ درصد گزارش دادند (۲۰). در مطالعه صبا و همکاران در سال ۲۰۱۸، ۴۳ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه با استفاده از آزمون ژلوز قرمز کنگو بیوفیلم مثبت بودند و با روش میکروتیتر پلیت ۹۲ درصد سویه ها به عنوان بیوفیلم مثبت گزارش شدند (۲۱). در مطالعه رحیمی و همکاران در سال ۲۰۱۶، ۸۲ درصد سویه - های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در آزمون ژلوز قرمز کنگو واجد کلنیهای سیاه رنگ بودند و در آزمون میکروتیتر پلیت نیز ۶۸ درصد به عنوان سویه های بیوفیلم مثبت معرفی شدند (۲۲). در مطالعه دیگری، رحیمی فراوانی سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مولد بیوفیلم در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری در سال ۲۰۱۸ را ۸۹ درصد گزارش نمود (۲۳). در سال ۲۰۱۵ در مطالعه ای که توسط رحیمی بر روی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از افراد سالم در شهر تهران به انجام رسید، فراوانی سویه های مولد بیوفیلم به روش آزمون ژلوز قرمز کنگو، ۶۷ درصد گزارش گردید (۱۷). تفاوت میان فراوانی سویه های مولد بیوفیلم در مطالعات مختلف می تواند ناشی از نوع نمونه های مورد بررسی و همچنین تفاوت در روشهای مورد استفاده در مطالعات مختلف باشد. بر اساس مطالعات انجام شده پیشین و همچنین مطالعه حاضر می توان گفت که روش ژلوز قرمز کنگو نسبت به روش میکروتیتر پلیت از حساسیت و دقت کمتری برخوردار است. در واقع می توان از روش کیفی ژلوز قرمر کنگو جهت غربالگری استفاده کرد و از آزمون تأییدی میکروتیتر پلیت جهت تعیین توانایی تشکیل بیوفیلم استفاده کرد. بررسی ژنهای درگیر در فرآیند تشکیل بیوفیلم بسیار حائز اهمیت است چرا که می تواند در یافتن راهکاری جهت درمان عفونتهای ناشی از باکتریهای بیوفیلم مثبت مؤثر باشد. در واقع آگاهی از ژنهای مؤثر در فرآیند تشکیل بیوفیلم با جلوگیری یا محدود کردن بیان آنها و یا غیرفعال کردن محصولات آنها می تواند مانع از تشکیل بیوفیلم شده و سبب افزایش اثر آنتی بیوتیکها و ترکیبات ضدباکتریایی بر عفونتهای ناشی از باکتریهای بیوفیلم مثبت گردد. در مطالعات مختلف در ایران و سایر کشورها حضور ژنهای مؤثر بر تشکیل بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

www.SID.ir

Archive of SID

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

نتیجه‌گیری

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

تقدیر و تشکر

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

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES

1- Herman-Bausier P, El-Kirat-Chatel S, Foster TJ, Geoghegan JA, Dufrêne YF. *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A mediates cell-cell adhesion through low-affinity homophilic bonds. MBio. 2015;6(3):e00413-15.

2- Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nature Reviews Microbiology. 2015;13(5):269.

3- Fihn SD. Acute uncomplicated urinary tract infection in women. New England Journal of Medicine. 2003; 349:259-266.

4- Petrelli D, Repetto A, D'ercole S, Rombini S, Ripa S, Prenna M, et al. Analysis of meticillin-susceptible and meticillin-resistant biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from catheter infections isolated in a large Italian hospital. Journal of Medical Microbiology. 2008;57(3):364-72.

5- Rahimi F. Biofilm production among *Staphylococcus aureus* strains isolated from healthy people. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine 2015;20(68):21-9.

6- Muder RR, Brennen C, Rihs JD, Wagener MM, Obman A, Obman A, et al. Isolation of *Staphylococcus aureus* from the urinary tract: association of isolation with symptomatic urinary tract infection and subsequent staphylococcal bacteremia. Clinical Infectious Diseases. 2006;42(1):46-50.

7- Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. Future Medicinal Chemistry. 2015;7(4):493-512.

8- Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. Virulence. 2011;2(5):445-59.

9- Gowrishankar S, Kamaladevi A, Balamurugan K, Pandian SK. In vitro and in vivo biofilm characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from patients associated with pharyngitis infection. BioMed Research International. 2016;2016:1-15.

10- Khoramian B, Jabalameli F, Niasari-Naslaji A, Taherikalani M, Emaneini M. Comparison of virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections. Microbial Pathogenesis. 2015;88:73-7.

www.SID.ir

Archive of SID

11- Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2015;10(5):7.

12- Gad GFM, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H, El-Baky RMA. Detection of *icaA, icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. Journal of Infection in Developing Countries. 2009;3(05):342-51.

13- Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characteristics of hospital-and community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. Journal of Medical Microbiology. 2014;63(6):796-804.

14- Rahimi F, Katouli M, Karimi S. Biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from catheterized patients with urinary tract infection. Microbial Pathogenesis. 2016;98:69-76.

15- Rahimi F, Bouzari M, Maleki Z, Rahimi F. Antibiotic susceptibility pattern among *Staphylococcus* spp. with emphasis on detection of *mecA* gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases. 2009;4(3):143-50.

16- Zouharova M, Rysanek D. Multiplex PCR and RPLA identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains from bulk tank milk. Zoonoses and Public Health. 2008;55(6):313-9.

17- Ghasemian A, Najar Peerayeh S, Bakhshi B, Mirzaee M. The mcrobial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) genes among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from hospitalized children. Iranian Journal of Pathology. 2015;10(4):258-64.

18- Yousefi M, Pourmand MR, Fallah F, Hashemi A, Mashhadi R, Nazari-Alam A. Characterization of *Staphylococcus aureus* biofilm formation in urinary tract infection. Iranian Journal of Public Health. 2016;45(4):485.

19- Ando E, Monden K, Mitsuhata R, Kariyama R, Kumon H. Biofilm formation among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with urinary tract infection. Acta Medica Okayama. 2004;58(4):207-14.

20- Khan F, Shukla I, Rizvi M, Mansoor T, Sharma S. Detection of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Does it have a role in treatment of MRSA infections. Trends in Medical Research. 2011;6(2):116-23.

21- Saba T, Sajid M, Khan AA, Zahra R. Role of intracellular adhesion *icaAD* and agr genes in biofilm formation in clinical *S. aureus* isolates and assessment of two phenotypic methods. Pakistan Journal of Medical Sciences. 2018;34(3):633-7.

22- Rahimi F, Karimi S. Biofilm Producing *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from clinical samples in Tehran, Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2016;11(3):e33343.

www.SID.ir

Archive of SID

23- Rahimi F. Molecular characteristics of biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates causing urinary tract infections. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2018;13(6):e61704.

24- Rezaei M, Moniri R, Mousavi SGA, Shiade MJ. Prevalence of biofilm formation among methicillin resistance *Staphylococcus aureus* isolated from nasal carriers. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013;6(6):e9601.

25- Mirzaee M, Najar-Peerayeh S, Behmanesh M, Forouzandeh-Moghadam M, Ghasemian A-M. Detection of intracellular adhesion (*ica*) gene and biofilm formation *Staphylococcus aureus* isolates from clinical blood cultures. Journal of Medical Bacteriology. 2014;3(1-2):1-7.

26- Vergara A, Normanno G, Di Ciccio P, Pedonese F, Nuvoloni R, Parisi A, et al. Biofilm formation and its relationship with the molecular characteristics of food-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Journal of Food Science. 2017;82(10):2364-70.

27- O'Gara JP. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiology Letters. 2007;270(2):179-88.

28- Joo H-S, Otto M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. Chemistry and Biology. 2012;19(12):1503-13.

29- Ghasemian A, Najar Peerayeh S, Bakhshi B, Mirzaee M. Several virulence factors of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients in Tehran. International Journal of Enteric Pathogens. 2015;3(2):1-6.

30-Kawamura H, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Miyanohara H, Hashiguchi T, et al. Quantitative analysis of biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains from patients with orthopaedic device-related infections. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2011;63(1):10-5.

www.SID.ir