

## Frequency Evaluation of *icaA* Gene in Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Clinical Specimens in Rasht

Habibi S<sup>1</sup>, Safarkar R<sup>\*2</sup>, Rouhi V<sup>2</sup>

1. Department of Microiology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

2. Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

\*Corresponding author. Tel: +984533719021, Fax: +984533727799, E-mail: Roya Safarkar@yahoo.com

Received: Oct 22, 2019 Accepted: Dec 21, 2019

### ABSTRACT

**Background & objectives:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is one of the most common causes of nosocomial infections. The polysaccharide adhesion mechanism encoded by the *ica* operon generates a direct role in biofilm formation and infection of the bacteria. The aim of this study was to evaluate the frequency of *icaA* gene in *Staphylococcus aureus* isolates isolated from clinical specimens of patients admitted to some clinical centers of Rasht.

**Methods:** This descriptive, cross-sectional study was performed on 100 *Staphylococcus aureus* isolates from some clinical centers of Rasht in 2019 and confirmatory tests were performed to identify the bacteria. *icaA* gene identification and its frequency were investigated using molecular methods. The antibiotic resistance pattern against 10 antibiotics and biofilm-forming ability of the isolates were determined using the disk diffusion method and Congo red method respectively.

**Results:** In the present study, among the 100 studied isolates, the highest drug resistance was related to penicillin, and the lowest antibiotic resistance was belonged to ciprofloxacin. 81 isolates (81%) were resistant to methicillin and 37 isolates (37%) had multiple resistance. Of 37 isolates with multiple resistances, 32 isolates (86.48%) had *icaA* gene and 24 isolates (64.9%) had the ability to produce strong biofilms.

**Conclusion:** According to the findings of this study, the prevalence of *Staphylococcus aureus* isolates carrying *icaA* gene with strong biofilm forming ability and resistance to methicillin, were high. This necessitates the need for serious management of antibiotic administration.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*; Antibiotic Resistance; Biofilm

## ارزیابی فراوانی ژن *icaA* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به چند دارو جدا شده از نمونه‌های بالینی در شهر رشت

ساناز حبیبی<sup>۱</sup>، رویا سفرکار<sup>۲\*</sup>، وحیدروحي<sup>۲</sup>

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۲. گروه زیست‌شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۳۷۱۸۰۲۱ فاکس: ۰۴۵۳۳ ۷۲۷۷۹۹ پست الکترونیک: RoyaSafarkar@yahoo.com

### چکیده

**زمینه و هدف:** *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین یکی از عوامل شایع در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. ژن‌های مربوط به اپرون *ica* پلی‌ساکاریدهای چسبنده بین سلولی را تولید می‌کنند که مستقیماً در تشکیل بیوفیلم و عفونت زایی این باکتری نقش اساسی دارد. این مطالعه به منظور بررسی فراوانی ژن *icaA* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های بالینی بیماران بستری در برخی از مراکز بالینی شهر رشت انجام گرفت.

**روش کار:** در این مطالعه توصیفی-مقطعی در سال ۹۸، تعداد ۱۰۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* از تعدادی از مراکز بالینی شهر رشت جمع‌آوری شده و آزمایشات تاییدی به منظور شناسایی باکتری انجام شد. سپس با روش‌های مولکولی شناسایی ژن *icaA* و میزان فراوانی آن بررسی گردید. بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها با روش انتشار دیسک در مقابل ۱۰ آنتی‌بیوتیک و همچنین توانایی تولید بیوفیلم به روش کنگو رد انجام شد.

**یافته‌ها:** در مطالعه حاضر از بین ۱۰۰ ایزوله بررسی شده بیشترین مقاومت دارویی متعلق به پنی‌سیلین و کمترین مقاومت متعلق به سیپروفلوکساسین بود. تعداد ۸۱ ایزوله (۸۱٪) مقاوم به متی‌سیلین و ۳۷ ایزوله (۳۷٪) مقاومت چندگانه داشتند. از بین ۳۷ ایزوله با مقاومت چندگانه، ۳۲ ایزوله (۸۶/۴۸٪) دارای ژن *icaA* و ۲۴ ایزوله (۶۴/۹٪) توانایی تولید بیوفیلم قوی داشتند.

**نتیجه‌گیری:** بر اساس یافته‌های این مطالعه، *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای ژن *icaA*، تولیدکننده بیوفیلم قوی، مقاوم به متی‌سیلین، شیوع بالایی دارد. این امر لزوم مدیریت جدی در تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها را یادآوری می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بیوفیلم

پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۳۰

دریافت: ۱۳۹۸/۷/۳۰

### مقدمه

کورک، کفگیرک، زرد زخم و عفونت‌های غیر چرکی مانند مسمومیت غذایی *استافیلوکوکوس*، بیماری کاوازاکی، و نیز باکتری‌می، سپتی‌سمی، پنومونی، اندوکاردیت، میوکاردیت، مننژیت، استئومیلیت و آبسه در نقاط مختلف می‌باشد [۳، ۲]. میزان شیوع

*استافیلوکوکوس اورئوس* یک کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که قادر به ایجاد عفونت‌های فرصت طلب بسیاری می‌باشد [۱]. این باکتری، عامل عفونت‌های چرکی پوست و بافت نظیر فولیکولیت،

عفونت‌های ناشی از این باکتری ۱۴/۵ درصد گزارش شده است [۴]. به طور معمول ۳۰-۲۵ درصد از افراد سالم جامعه، ناقل این باکتری در بخش پیشین حفره بینی خود هستند. همچنین پزشکان، پرستاران و کارکنان بخش‌های مختلف بیمارستانی به ترتیب ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درصد ناقل این باکتری می‌باشند، لذا می‌توانند موجب انتقال آلودگی به بیماران بستری شوند. ظهور ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، مشکلات فراوانی را در درمان عفونت‌های حاصل از این ارگانیزم‌ها ایجاد کرده است [۵]. این باکتری یکی از مهمترین عوامل در ایجاد عفونت بیمارستانی است که نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله متی‌سیلین [۱]، بتالاکتام‌ها، آمینو گلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها، فلوروکوئینون‌ها و ماکرولیدها مقاومت نشان می‌دهد. از این رو امروزه تعداد محدودی از آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان داروی ضد *استافیلوکوکوس* در دسترس می‌باشد. بروز عفونت‌های *استافیلوکوکوس* در سال‌های اخیر به دلیل انتشار ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، افزایش بیماران با ضعف سیستم ایمنی و استفاده بیش از حد از وسایل پزشکی رو به افزایش است [۶].

یکی از مکانیسم‌های اصلی در توسعه عفونت‌های بیمارستانی توانایی تشکیل بیوفیلم است. بیوفیل‌ها به‌عنوان اجتماع سازمان‌یافته‌ای از باکتری‌ها هستند که به سطوح می‌چسبند و شامل ترکیبات مختلفی مانند پلیمرهای خارج‌سلولی و از جنس آگزوپلی ساکاریدها، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها می‌باشند. یکی از ویژگی‌های بیوفیلم باکتریایی افزایش مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر نسبت به سلول‌های پلانکتونی است. به‌دلیل ویژگی‌های متمایز و نقش بیوفیل‌ها در کاهش نفوذ دارو به داخل سلول‌های باکتریایی، باکتری‌های مولد بیوفیلم مقاومت دارویی زیادی داشته و استفاده از روش‌های درمانی متفاوت برای درمان اینگونه عفونت‌ها مورد

نیاز است [۷-۹]. بطور کلی بیوفیل‌ها یک شرایط بسیار مناسب برای تبادل DNA خارج کروموزومی را مهیا می‌کنند. هم یوگی (کانزوگاسیون = مکانیسم انتقال پلاسمید) به میزان بیشتری در سلول‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم نسبت به سلول‌های پلانکتونیک رخ می‌دهد. ایزوله‌هایی که حاوی پلاسمید هستند قادر به انتقال پلاسمیدها به ارگانیزم‌های میزبان بوده و باعث شکل‌گیری بیوفیلم می‌شوند، اما بدون پلاسمیدها این ارگانیزم‌ها تنها قادر به ایجاد میکروکلنی‌هایی بدون رشد و نمو می‌باشند [۱۰].

*استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان یک پاتوژن بیمارستانی قابلیت تشکیل بیوفیلم و مزمن شدن بیماری در شخص آلوده را دارد. این باکتری توانایی اتصال به سطوح مختلف از قبیل ونتیلاتورهای مکانیکی، کاتتر و بافت‌های میزبان را دارا است [۱۱]. گسترش آلودگی و همچنین تشکیل بیوفیلم در تجهیزات و وسایل پزشکی منجر به افزایش عفونت‌های بیمارستانی شده و تلاش برای حذف این گونه آلودگی‌ها را ضروری ساخته است. اپرون *icaABCD* این ارگانیزم که دربرگیرنده ژن‌های *icaB* *icaC* *icaA* است به واسطه سنتز پلی ساکارید بین سلولی و کپسول پلی‌ساکاریدی، می‌تواند در تشکیل بیوفیلم نقش داشته باشد [۱۲]. تشکیل بیوفیلم، حساسیت به درمان‌های ضد میکروبی را کاهش می‌دهد که نهایتاً هزینه‌های درمانی بالایی برای بیماران به دنبال خواهد داشت.

با توجه به شیوع بالای عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و مقاومت آنتی‌بیوتیکی روز افزون این باکتری، بررسی عوامل ایجادکننده عفونت و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توانایی تولید بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های جداشده از عفونت‌های ناشی از این باکتری در بیمارستان‌های مختلف شهر رشت حائز اهمیت می‌باشد. لذا این مطالعه با هدف بررسی فراوانی ژن *icaA* و الگوهای مقاومتی به‌دست‌آمده نسبت به متی‌سیلین و آنتی‌بیوتیک‌های

حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک در آگار (کربی-باثر)<sup>۱</sup> انجام شد. الگو حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار دیسک و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک سفت‌آزیدیم (۳۰ میکرو گرم)، آموکسی‌سیلین (۳۰ میکرو گرم)، تیکوپلانین (۳۰ میکرو گرم)، پنی‌سیلین (۱۰ میکرو گرم)، سیپروفلوکساسین (۱۵ میکرو گرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکرو گرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکرو گرم)، اریترومایسین (۱۵ میکرو گرم)، متی‌سیلین (۵ میکرو گرم)، جنتامیسین (۱۰ میکرو گرم) تهیه شده از شرکت Mast انگلستان طبق دستورالعمل CLSI انجام پذیرفت [۱۴].

#### ارزیابی فنوتیپی تولید بیوفیلیم به روش کنگورد (CRA)

پس از انجام تست آنتی‌بیوگرام، ایزوله‌های با مقاومت چندگانه نسبت به متی‌سیلین و دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها انتخاب شدند. محیط کنگورد آگار با مخلوط کردن ۳۷ گرم BHI agar، ۵۰ گرم ساکارز، ۰/۸ گرم کنگورد و ۱۰ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر تهیه شد. سپس محلول فوق با شرایط ۱۲۱ درجه سلسیوس، ۱۵ پوند به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گشت. برای انجام این آزمون از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط کنگورد کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرماگذاری شد. بعد از نگهداری پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای اتاق رنگ محیط و کلنی از لحاظ تشکیل بیوفیلیم بررسی شد. کلنی‌های قرمز بیوفیلیم منفی، کلنی‌های قرمز روی زمینه محیط سیاه بیوفیلیم + (بیوفیلیم ضعیف)، کلنی‌های سیاه روی زمینه محیط قرمز بیوفیلیم ++ (بیوفیلیم متوسط) و کلنی‌های سیاه روی زمینه محیط سیاه بیوفیلیم +++ (بیوفیلیم قوی) ارزیابی شدند [۱۶، ۱۵].

#### ارزیابی ژنوتیپی حضور ژن *icaA*

استخراج DNA ژنومی از باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از کیت و طبق

مختلف توسط روش‌های استاندارد تعیین حساسیت ضد میکروبی نظیر انتشار از دیسک، با نتایج حاصل از روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) انجام گرفت.

#### روش کار

##### شناسایی فنوتیپی اولیه باکتری

در این مطالعه توصیفی-مقطعی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد رشت با کد REC.IAU.LIAU.1398.012 در طی شش ماه از آبان ماه ۹۷ تا اردیبهشت ماه ۹۸ تعداد ۱۰۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* از بیماران سرپایی و بستری بیمارستان‌ها و مراکز درمانی منتخب شهر رشت با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۹۵٪، میزان خطای ۵٪ جمع‌آوری و بررسی شدند. جمعیت مورد مطالعه شامل بیماران مراجعه کننده به بخش‌های مختلف بیمارستان و مراکز درمانی رشت بودند. برای تمامی بیماران پرسشنامه ای تهیه و اطلاعات مورد نیاز (نظیر سن، جنس، محل عفونت) با رعایت منشور اخلاقی ثبت گردید. نمونه‌ها شامل خون، ادرار، کشت خون و سایر نمونه‌ها (خلط و آبرسه) بودند. این مطالعه بر اساس آزمون‌های توصیفی انجام و این تعداد نمونه انتخاب گردید. این نمونه‌ها جهت کشت بر روی محیط‌های بلاد آگار، مانیتول سالت آگار و کروم آگار *استافیلوکوکوس اورئوس* انتقال داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه قرار داده شد. جهت تعیین هویت گونه‌های باکتری از آزمون‌های بیوشیمیایی استفاده شد [۱۳، ۱۴]. جهت بررسی کنترل کیفی آزمایشات از ایزوله استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC25923) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

##### ارزیابی میزان مقاومت دارویی باکتری

به منظور بدست آوردن الگوی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های ایزوله شده از بیماران، تست

<sup>1</sup> Kirby-Bauer

به منظور انجام آنالیز آماری و تجزیه و تحلیل نتایج از نرم افزار SPSS-22 استفاده شد. در این مطالعه، به منظور گزارش یافته‌ها از آمار توصیفی و برای بررسی ارتباط بین متغیرها از آزمون آماری مجذور کای استفاده شد. برای مقایسه بین گروه‌های فیلوژنی و توزیع مقاومت دارویی و مقایسه فراوانی این مقاومت در بین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، آزمون دقیق فیشر به کار گرفته شد و اختلافات آماری بین حضور و فراوانی فاکتور کدکننده مقاومت در ایزوله‌های جدا شده از عفونت بر پایه ضریب اطمینان ۹۵٪ ( $p < 0.05$ ) مورد بررسی قرار گرفت.

#### یافته‌ها

از میان ۱۰۰ ایزوله جمع‌آوری شده، ۷۳ بیمار (۷۳٪) مرد و ۲۷ بیمار (۲۷٪) زن ارزیابی شد. میانگین سنی بیماران  $48 \pm 4/5$  سال بود. نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام نمونه‌ها نشان داد که بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین ۹۰ ایزوله (۹۰٪)، سفوتاکسیم ۸۴ ایزوله (۸۴٪)، سفتازیدیم ۸۷ ایزوله (۸۷٪) و بیشترین میزان حساسیت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین ۵۹ ایزوله (۵۹٪) و جنتامایسین ۳۷ ایزوله (۳۷٪) بود. همچنین از بین ۱۰۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* ۸۱ ایزوله (۸۱٪) مقاوم به متی‌سیلین و ۳۷ ایزوله (۳۷٪) مقاومت چندگانه داشتند (جدول ۲).

نتایج حاصل از بررسی کیفی تشکیل بیوفیلم در روش کنگورد آگار در ۳۷ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها، نشان داد که در نمونه‌های مورد بررسی، ۵ ایزوله (۱۳/۵٪) بیوفیلم منفی (کلنی‌های قرمز)، ۳ ایزوله (۸/۱٪) بیوفیلم ضعیف (کلنی‌های قرمز روی زمینه محیط سیاه)، ۵ ایزوله (۱۳/۵٪) بیوفیلم متوسط (کلنی‌های سیاه روی زمینه محیط قرمز) و ۲۴ ایزوله (۶۴/۹٪) بیوفیلم قوی (کلنی‌های سیاه روی زمینه سیاه) بودند (شکل ۱).

دستورالعمل کیت استخراج ساینژ (Cinna Pure DNA KIT-PR881613) صورت گرفت. برای انجام PCR از توالی‌های اولیگونوکلئوتیدی پرایمرهای اختصاصی برای ژن *icaA* استفاده شد که شامل

icaA-F:5-GAGGTAAAGCCAACGCACTC-3

و

icaA-R: 5-CCTGTAACCGCACCAAGTTT-3

می‌باشد [۱۷] و طول قطعه تکثیر شده توسط این پرایمر ۱۵۱ جفت باز گزارش شده است. در این پژوهش از مخلوط واکنش (PCR Pre MIX تکاپوزیست) استفاده گردید که شامل ۱ میکرومول (۱ میکرولیتر) از هر پرایمر (تکاپوزیست)، ۱۳ میکرولیتر مخلوط واکنش، ۸ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر و ۱ میکرولیتر از DNA الگو بود اضافه شد و برای اثبات غلظت کافی DNA الگو از گرادینت غلظت DNA از ۲ میکرولیتر استفاده و حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد و این مخلوط در دستگاه ترموسایکلر (PCR analytic jena, Germany) قرار گرفت. برنامه اجرایی سیکل‌های PCR به ترتیب زیر بود: واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل حرارتی شامل واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر به DNA الگو در ۵۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن رشته الگو در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و در انتها دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول بدست آمده از نظر حضور ژن مورد نظر با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد در ولتاژ ۱۲۰ ولت به مدت ۴۰ دقیقه تنظیم شده و پس از گذشت این زمان، ژل را در مجاورت نور UV قرار داده و نتیجه مشاهده شد.

#### تجزیه و تحلیل آماری

22 و آزمون تی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود دارد ( $p < 0.05$ ). علاوه بر این نتایج حاکی از آن بود که بین فراوانی ژن‌ها در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و جنسیت بیماران اختلاف معناداری وجود ندارد.

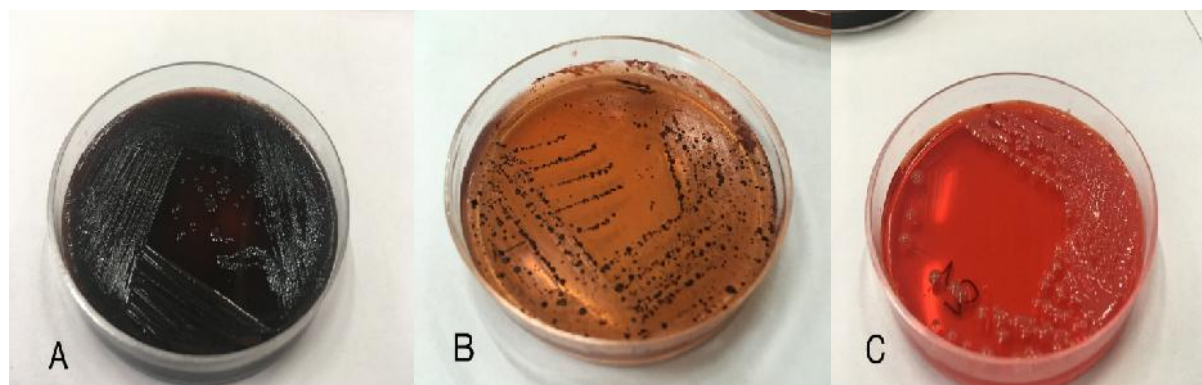
شکل ۲ نتایج واکنش زنجیره ای پلیمرز جهت شناسایی ژن *icaA* در *استافیلوکوکوس اورئوس* بر روی ژل آگاروز را نشان می‌دهد. میزان فراوانی ژن *icaA* در ۳۷ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* با مقاومت چندگانه، ۳۲ ایزوله (۸۶/۴۸٪) به دست آمد. رابطه بین حضور ژن *icaA*، توانایی تولید بیوفیلیم و مقاومت باکتری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-

جدول ۱. توزیع فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های اخذ شده از عفونت‌های بالینی

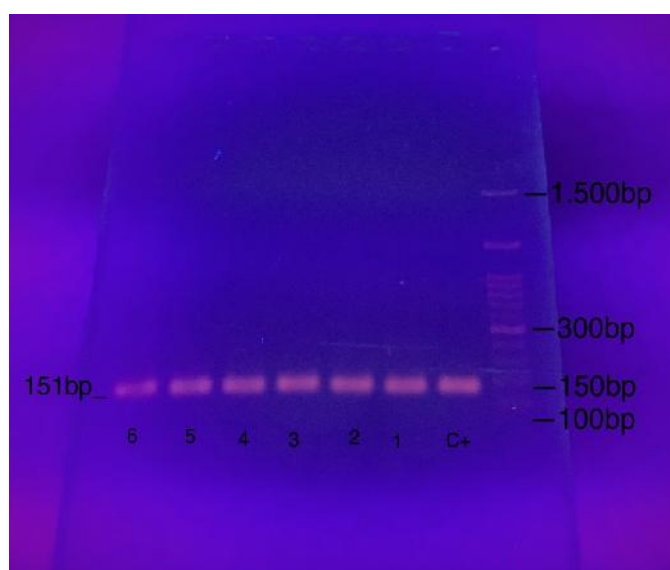
محل جداسازی نمونه	تعداد ایزوله‌های جدا شده از بیماران		تعداد ایزوله‌های جدا شده از عفونت‌های بالینی	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
زخم	۳۸	۱۱	۲۹	۲۷
خون	۱۹	۴	۲۱	۱۵
تراشه آسپیره	۱۰	۳	۳۰	۷
آبسه	۸	۲	۲۵	۶
ادرار	۱۶	۵	۳۱	۱۱
زخم بستر	۴	۱	۲۵	۳
کاتتر	۳	۱	۳۳	۲
مایع مفصلی	۲	۰	۰	۲

جدول ۲. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده

آنتی بیوتیک	غلظت دارو	تعداد سویه‌های حساس فراوانی (درصد)	تعداد سویه‌های حدواسط فراوانی (درصد)	تعداد سویه‌های مقاوم فراوانی (درصد)
سفتازیدیم	۳۰ μg	۱۰ (۱۰)	۳ (۳)	۸۷ (۸۷)
آموکسی سیلین	۳۰ μg	۲۰ (۲۰)	—	۸۰ (۸۰)
تیکوپلانین	۳۰ Mg	۲۲ (۲۲)	۱ (۱)	۷۷ (۷۷)
پنی سیلین	۱۰ μg	۱۰ (۱۰)	—	۹۰ (۹۰)
سیپروفلوکساسین	۱۵ Mg	۵۹ (۵۹)	۸ (۸)	۳۳ (۳۳)
اریتروماکسیم	۱۵ μg	۸ (۸)	۱۴ (۱۴)	۷۸ (۷۸)
سفوتاکسیم	۳۰ μg	۱۰ (۱۰)	۶ (۶)	۸۴ (۸۴)
متی سیلین	۵ μg	۱۷ (۱۷)	۲ (۲)	۸۱ (۸۱)
تتراسایکلین	۳۰ μg	۲۷ (۲۷)	۶ (۶)	۶۷ (۶۷)
جنتامیسین	۱۰ μg	۳۷ (۳۷)	۷ (۷)	۵۶ (۵۶)



شکل ۱. نتایج بیوفیلم در محیط کشت کنگورد آگار: A: بیوفیلم قوی (کلنی‌های سیاه رنگ بر روی زمینه سیاه)، B: بیوفیلم متوسط (کلنی‌های سیاه رنگ بر روی محیط قرمز)، C: بیوفیلم ضعیف (کلنی‌های قرمز رنگ بر روی محیط قرمز)



شکل ۲. نمایش الکتروفورز محصولات PCR جهت جستجوی ژن *icaA*

C+: کنترل مثبت. ایزوله‌های شماره ۹۳، ۷۰، ۴۸، ۲۳، ۱۱، ۷ به ترتیب در چاهک‌های ۱ تا ۶ نشان داده شده است.

## بحث

فاگوسیت‌کننده و استرس‌های محیطی مقاومت کند. مطالعه توانایی تشکیل بیوفیلم و مشخص کردن ژن‌های دخیل در آن در ایزوله‌های مختلف استافیلوکوکی می‌تواند به فهم بهتر فرایند تشکیل بیوفیلم کمک کند. از اهداف این مطالعه بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و همچنین بررسی توانایی تولید بیوفیلم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش فنوتیپی و ژنوتیپی می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که توانایی تشکیل بیوفیلم، با گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به ویژه مقاومت به متی‌سیلین در نمونه‌های عفونی مرتبط می‌باشد. مطالعات زیادی در

مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از جمله عواملی است که درمان عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را با چالش بزرگی مواجه کرده است، لذا میزان بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی از جمله متی‌سیلین و مقاومت‌های چندگانه آنتی‌بیوتیکی امروزه بسیار نگران‌کننده است. توانایی چسبیدن و تشکیل بیوفیلم روی مخاط و وسایل پزشکی یکی از فاکتورهای اصلی ویرولانس در گونه‌های *استافیلوکوکی* می‌باشد. بیوفیلم باعث می‌شود تا باکتری در برابر عواملی چون حضور آنتی‌بیوتیک‌ها، پاسخ ایمنی میزبان، عوامل

درصد گزارش شد [۲۱]. همچنین در مطالعه تیواری<sup>۱</sup> و همکاران ۷۸۳ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش‌های استاندارد و آزمایشگاهی جداسازی شدند. ایزوله‌ها از نظر مقاومت به ونکومايسين با تست‌های میکرودايلوشن و دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفتند، در این مطالعه مقاومت به پنی‌سیلین ۸۱/۵ درصد گزارش شد [۲۲] که با نتایج تحقیق حاضر در مقاومت به پنی‌سیلین و دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها همخوانی دارد. بروز این میزان مقاومت بسیار نگران‌کننده است و لزوم توجه به تجویز مناسب آنتی‌بیوتیک‌های مختلف را مشخص می‌کند.

نتایج حاصل از تولید بیوفیلم به روش کنگورد نشان می‌دهد که تمام ایزوله‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم قوی حاوی ژن *icaA* بودند. در مطالعه ای که نوربخش و همکاران انجام دادند ۷۳ درصد از ایزوله‌ها توانایی تولید بیوفیلم قوی را داشتند [۲۳]. در مطالعه ای مشابه، شاهکرمی و همکاران بررسی فراوانی اپرون *ica* در *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* را انجام دادند، نتایج نشان داد که ۷۰ درصد ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، توانایی تولید بیوفیلم قوی را داشتند [۱۶]. این مطالعات با کمی اختلاف با مطالعه حاضر همسو بود که می‌تواند به دلیل مشابه بودن مکان مورد مطالعه باشد. لیدوما<sup>۲</sup> و همکاران نشان دادند در تشکیل بیوفیلم، ژن‌های *aap* و *icaA* نقش مهمی بازی می‌کنند، اما وجود این دو برای تشکیل بیوفیلم کافی نیست، بطوری‌که در ایزوله‌های *icaA+/aap+* بیوفیلم منفی مشاهده شده است (۲۴). بر طبق یافته‌های سوزوکی<sup>۳</sup> و همکاران حتی محل آناتومیک و محیط فیزیولوژیکی که از آن نمونه‌ها جدا شده است ممکن است در تشکیل بیوفیلم تاثیر گذار باشد، بطوری‌که فراوانی اپرون *ica* در ایزوله‌های جدا شده از کیسه ملتحمه ۶۰ درصد و در

ایران و جهان در زمینه بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام گرفته است. با توجه به تفاوت در الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بسته به مناطق جغرافیایی مختلف، می‌توان *استافیلوکوکوس اورئوس* را به عنوان یک عامل عفونی گسترده با الگوی مقاومتی بالا در سطح بیمارستان‌ها مطرح نمود که با تغییر شرایط جغرافیایی و منطقه مورد بررسی می‌توان الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی متنوعی را برای آن ارائه کرد [۱۸].

در مطالعه حاضر، تعداد ۱۰۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جمع‌آوری گردید و تست‌های آنتی‌بیوگرام جهت مشخص کردن میزان مقاومت دارویی این باکتری انجام شد. نتایج حاصل نشان داد که درصد بالایی از ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در بازار مقاومت دارند بطوری‌که بیشترین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین (۹۰٪) و کمترین مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین (۳۳٪) بود. این امر نشان می‌دهد این آنتی‌بیوتیک می‌تواند مهارکننده مناسبی برای ایزوله‌های مقاوم باشد اما وجود ۳۳ درصد ایزوله مقاوم و ۸ درصد ایزوله نیمه حساس، هشدار برای شیوع مقاومت و تبدیل سوپه‌های نیمه حساس به مقاوم است. همچنین در این تحقیق ۸۱ درصد ایزوله‌ها مقاوم به متی‌سیلین و ۱۷ درصد ایزوله‌ها حساس به این آنتی‌بیوتیک بودند. آمارهای متفاوتی از شیوع ایزوله‌های مقاوم *استافیلوکوکوس اورئوس* در کشورهای مختلف در اختیار می‌باشد. به عنوان مثال در کشورهای آسیایی همچون عربستان سعودی و هند این آمار به ترتیب ۸ و ۴۴ درصد گزارش شده است [۱۹،۲۰].

در مطالعه صفدری و همکاران که بر روی ۱۰۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های بالینی انجام شد، تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن صورت گرفت. میزان مقاومت به پنی‌سیلین ۹۷ درصد و مقاومت به اگزاسیلین ۶۳

<sup>1</sup> Tiwari

<sup>2</sup> Liduma

<sup>3</sup> Suzuki



استافیلوکوکی ممکن است تحت تاثیر چندین عامل باشد و نیز این فاکتور ویروانس قابل انتقال به *استافیلوکوکوس اورئوس* های دیگر نیز می باشد، بنابراین خطر اپیدمی آلودگی با چنین ایزوله هایی در بیمارستان ها و نیز در بین بیماران بستری شده وجود دارد و لازم است تدابیر درمانی مناسب، به کار گرفته شود.

#### محدودیت پژوهش

از محدودیت های اجرایی مطالعه می توان به عدم همکاری مراجعین در تکمیل پرسشنامه ها و احتمال مصرف آنتی بیوتیک توسط بیماران اشاره کرد.

ایزوله های جدا شده از پوست ۱۵ درصد گزارش شده است (۲۵). لذا علت اختلافات موجود در این مطالعات می تواند متفاوت بودن زمان های مورد بررسی در مطالعات و همچنین حجم نمونه های مورد بررسی باشد، چرا که در هر کدام از بررسی ها، حجم های متفاوتی مورد بررسی قرار گرفته است.

#### نتیجه گیری

مطالعه حاضر شیوع بالای ژن های *icaA* در جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* در شهر رشت را نشان می دهد. همچنین ارتباط بین توانایی تولید بیوفیلم و مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی به وضوح مشاهده شد. از آنجایی که تشکیل بیوفیلم در گونه های

#### References

- 1- Harkins CP, Pichon B, Doumith M, Parkhill J, Westh H, Tomasz A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. *Genome Biol.* 2017 Dec;18(1):130.
- 2- Koosha RZ, Hosseini HM, Aghdam EM, Tajandareh SG, Fooladi AA. Distribution of *tsst-1* and *mecA* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. *Jundishapur J Microbiol.* 2016 Mar;9(3) : e29057.
- 3- Abdal N, Ghaznavi Rad, Hamidi A, Hosseini SD. Prevalence of genes encoding aminoglycoside resistant in methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from hospital infectious. *Koomesh.* 2014;16(1): 82-89. [Full text in Persian]
- 4- Sh AY, Diba K. Prevalence of bacterial and fungal flora operating rooms in hospitals of Urmia University of Medical Sciences. *Urmia Med J.* 2004;15(1):9-15. [Full text in Persian]
- 5- Mansouri Ghiasi MA, Nasrollahi Omran A, Hashemi M, Rajab Zade Kanafi P, Jahangiri Rad Manjili M. The prevalence of antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from nasal carriage of surgical ward's staff in Shahid rajaei hospital of Tonekabon. *Med Lab J.* 2013 Apr; 15;7(1):35-9. [Full text in Persian]
- 6- Tomovic S, Friedel ME, Liu JK, Eloy JA. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skull base osteomyelitis with occipital condylar cerebrospinal fluid leak in an immunocompetent patient. *The Laryngoscope.* 2012 May;122(5):977-81.
- 7- Neopane P, Nepal HP, Shrestha R, Uehara O, Abiko Y. In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. *Int J Gen Med.* 2018;11:25-32.
- 8- Mirzaee M, Najjar-Peerayeh S, Behmanesh M, Forouzandeh Moghadam M, Ghasemian AM. Biofilm formation and presence of *ica* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from intensive care unit. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2014 Aug; 24(115):43-51. [Full text in Persian]
- 9- Tamber S, Cheung AL. Sar Z promotes the expression of virulence factors and represses biofilm formation by modulating Sar A and *agr* in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2009 Jan;77(1):419-28.
- 10- Donlan R, R Murga, J Carpenter, E Brown, R Besser, and B Fields. Monochloramine disinfection of biofilm-associated *Legionella pneumophila* in a potable water model system. In :R Marre, Y Abu Kwaiq, C Bartlett, N P Cianciotto, B S Fields, M Frosch, J Hacker, and P C Luck ed *Am Soc Microbiol., Washington D C,* 2002 Jan: 406-410.

- 11- Sajith Khan AK, Shetty PJ, Lakshmi Sarayu Y, Chidambaram A, Ranganathan R. Detection of *mecA* genes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Int J Health Rehabil Sci*. 2012Jan;1(2):64-8.
- 12- Mashaieki S, Amini K. Antibiotic resistance pattern and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolates and *Staphylococcus epidermidis* isolated from hospital infections Tehran in 2016. *J Birjand Univ Med Sci*. 2018 June ; 25(2): 160-166.
- 13- Cheesbrough M. *District laboratory practice in tropical countries*. Cambridge university press; 2006 Mar: 62.
- 14- Wayne PA. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved standard, 9<sup>th</sup> Ed. 2011; 100-121.
- 15- Barakat GI, Nabil YM. Correlation of mupirocin resistance with biofilm production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from surgical site infections in a tertiary centre, Egypt. *J global Antimicrob Resist*. 2016 Mar;1(4):16-20.
- 16- Shahkarami F, Rashki A. Prevalence of *ica* operon related genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Iran J Med Microbiol*. 2016 Feb;9(4): 16-23. [Full text in Persian]
- 17- Atshan SS, Shamsudin MN, Karunanidhi A, van Belkum A, Lung LT, Sekawi Z, et al. Quantitative PR analysis of genes expressed during biofilm development of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Infect Genet Evol*. 2013 Aug;1(18):106-12.
- 18- Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, et al. Identification of *Staphylococcus aureus* DNase and mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2010 Aug;9:23.
- 19- Al Tawfiq JA. Father to infant transmission of community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006 Jun;27(6):636-7.
- 20- Tyagi A, Kapil A, Singh P. Incidence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in pus samples at a tertiary care hospital, AIIMS, New Delhi. *J Indian Acad Clin Med*. 2008 Jan;9(1):33-5.
- 21- Safdari H, Sadeghian A, Tahaghoghi S. The antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from patients in Quam University hospital during 2009-2011. *J Paramed Sci Rehabil*. 2012;1(1):43-6. [Full text in Persian]
- 22- Tiwari HK, Sen MR. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *BMC Infect Dis*. 2006 Dec 1;6(1):156.
- 23- Nourbakhsh F, Momtaz H. Evaluation of phenotypic and genotypic biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates isolated from hospital infections in Shahrekord, 2015. *J Arak Univ Med Sci*. 2016 Jul;19(4):69-79. [Full text in Persian]
- 24- Līduma I, Tračevska T, Bērs U, Žileviča A. Phenotypic and genetic analysis of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Medicina*. 2012 Jun;48(6):305-9.
- 25- 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 Nov ;140(5):844-50.