دوره ۲۱، شماره ۶۷، پاییز ۱۳۹۷، صفحات: ۱۹-۱۰

مقاله پژوهشی

بررسی تشکیل بیوفیلم و اسلایم کدشونده توسط ژن‌های *icaA* و *icaD* در *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین حاوی ژن *mecA* در شهرستان شاهرود در سال ۱۳۹۶

نازیلا ارباب سلیمانی[۱*]، مرمر ولیخانی[۲]، الهه تاج‌بخش[۳]

[۱] استادیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

[۲] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

[۳] دانشیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۱۵ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۷/۰۸/۱۵

چکیده

مقدمه: امروزه دانشمندان بر این باور هستند که اتصال و تشکیل بیوفیلم از عوامل اولیه در بیماری‌زایی باکتری‌ها هستند. در این ارتباط، پژوهش حاضر با هدف بررسی وجود همزمان دو ژن دخیل در تولید اسلایم و بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین حاوی ژن *mecA* و ارتباط آن‌ها با بیماری‌زایی این باکتری انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی- مقطعی ۱۰۰ نمونه زخم از یکی از بیمارستان‌های شاهرود در سال ۱۳۹۶ جمع‌آوری گردید و جداسازی و خالص‌سازی *استافیلوکوکوس اورئوس* صورت گرفت. باید خاطرنشان ساخت که مقاومت به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین با استفاده از روش کربی- بوئر (Kirby–Bauer) بررسی گردید و ارزیابی تولید اسلایم و تشکیل بیوفیلم به‌ترتیب با استفاده از روش‌های کونگو رد آگار (Congo Red Agar) و میکروتیتر پلیت (Microtiter Plate) ۹۶ خانه‌ای انجام شد. به‌منظور بررسی ارتباط سه ژن *mecA*، *icaA* و *icaD* نیز از روش Multiplex PCR (Multiplex Polymerase Chain Reaction) استفاده گردید.

یافته‌ها: در این پژوهش ۶۵ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جداسازی شدند که به‌ترتیب ۶۷ و ۶۶/۶ درصد از آن‌ها قادر به تولید اسلایم قوی با کلنی سیاه و تشکیل بیوفیلم قوی بودند. شایان ذکر است که وجود همزمان سه ژن *mecA*، *icaA* و *icaD* در ۸۹/۲۳ درصد از نمونه‌ها مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج بین بیماری‌زایی و مقاومت به آنتی‌بیوتیک در *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین ارتباط وجود دارد که این مهم برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری باید در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، اسلایم، بیوفیلم، ژن‌های *ica* و *mecA*

* **نویسنده مسئول:** نازیلا ارباب سلیمانی، گروه میکروبیولوژی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران. تلفن: ۰۲۱۸۸۸۷۶۸۰۸؛ ایمیل: nazilaarbab@yahoo.co.uk

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین یکی از عوامل شایع در عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. امروزه به دلیل مقاومت همزمان به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها، درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری دشوارتر شده است (۱،۲). مقاومت به متی‌سیلین به وسیله یک قطعه کروموزومی ۲ کیلوبازی که حاوی ژن *mecA* بوده و در ناحیه ۲۷ تا ۶۰ کیلوبازی به نام mec قرار گرفته است، ایجاد می‌شود. شایان ذکر است که آلل مشابه این ناحیه در سویه‌های حساس وجود ندارد (۳). این ژن پروتئینی به نام PBP2 (Penicillin-Binding Proteins 2a) را تولید می‌کند که تمایل کمی برای اتصال به داروهای β–لاکتام دارد. این پروتئین توسط این داروها مهار نشده و موجب مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های β–لاکتامی به‌ویژه متی‌سیلین می‌گردد (۳،۴).

از دیگر عوامل مهمی که در بیماری‌زایی این باکتری نقش دارند می‌توان به تشکیل بیوفیلم و تولید اسلایم اشاره کرد (۵). سویه‌هایی از *استافیلوکوکوس اورئوس* که بیوفیلم و اسلایم تولید می‌کنند، ظرفیت کلونیزاسیون بالاتری نسبت به سویه‌هایی که این دو عامل را تولید نمی‌کنند، دارند که این امر منجر به مقاومت بالا نسبت به درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود (۵). اسلایم ماده‌ای خارج سلولی از جنس پلی‌ساکارید است که در اتصال به سطوح همانند یک ماتریکس سیمانی عمل کرده و سلول باکتری را قادر می‌سازد تا بیوفیلم را به‌صورت لایه‌لایه انباشته نموده و باکتری را از دسترس سیستم ایمنی میزبان حفظ کند (۵،۶).

بیوفیلم‌های باکتریایی، تجمعات پیچیده‌ای از باکتری‌ها هستند که در یک پوشش گلیکوکالیکس محصور شده و به سطوح مخاطی می‌چسبند (۵،۷). توانایی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین برای تشکیل بیوفیلم به باکتری کمک می‌کند تا در بدن میزبان زنده بماند و باعث عفونت‌های مزمن شود (۷). عامل اصلی در تشکیل بیوفیلم این باکتری یک پلی‌ساکارید داخل سلولی چسبنده (N–استیل‌گلوکزآمین) است که دارای بار خالص مثبت بوده و می‌تواند باعث ارتباطات بین سلولی با اتصال به سطوح با بار منفی شود و از این طریق از سلول‌های باکتریایی حمایت کند (۸). با تولید اسلایم و تشکیل بیوفیلم، سلول‌ها از نظر فنوتیپی تغییر می‌کنند. باید خاطرنشان ساخت که اپرون *ica*ADBC در این امر دخالت دارد (۵،۹). لوکوس *ica* که دربرگیرنده ژن‌های *icaC*، *icaB*، *icaD* و *icaA* است، واسطه‌های پروتئینی را کد می‌کند و به سنتز پلی‌ساکارید بین سلولی و کپسول پلی‌ساکاریدی در *استافیلوکوکوس اورئوس* منجر می‌شود. لازم به ذکر است که هر دوی این ژن‌ها در شیوع بالای این باکتری مشاهده شده‌اند (۱۰). در حقیقت، ژن *icaA* آنزیم N–استیل‌گلوکزآمینیل ترانسفراز را کد می‌کند. این آنزیم در سنتز الیگومرهای N–استیل‌گلوکزآمین از N–UDP–استیل‌گلوکزآمین نقش دارد (۶،۱۱). باید خاطرنشان ساخت که ژن *icaD* نقش مهمی در حداکثر بیان آنزیم N–استیل‌گلوکزآمینیل ترانسفراز دارد و منجر به بیان فنوتیپیک پلی‌ساکارید خارج سلولی می‌شود (۶،۱۱).

از آنجایی که در برخی از مطالعات نشان داده شده است که بیان همزمان دو ژن *icaA* و *icaD* در *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین حاوی ژن *mecA* در تشکیل بیوفیلم و اسلایم این باکتری نقش دارد و سبب افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بیماری‌زایی می‌شود (۱۲،۱۳)، در پژوهش حاضر حضور همزمان این دو ژن مؤثر بر تشکیل بیوفیلم و اسلایم *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین حاوی ژن *mecA* بررسی

گردید.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

در این مطالعه ۱۰۰ نمونه زخم مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* از بیمارستان شاهرود جمع‌آوری گردید. جداسازی و خالص‌سازی نمونه‌ها روی محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck، آلمان) با استفاده از کشت خطی انجام شد. در ادامه، باکتری‌های خالص‌شده با استفاده از آزمون‌های متداول بیوشیمیایی برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تأیید شدند. سپس، مقاومت به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین با استفاده از روش کربی- بوئر بررسی گردید که بر مبنای نتایج، ۶۵ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بودند.

بررسی تولید اسلایم استافیلوکوکوس اورئوس

ابتدا کشت شبانه از باکتری‌های بیماری‌زا در محیط تریپتیک سوی براث (Merck، آلمان) تهیه شد. به‌منظور بررسی تولید اسلایم، باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت روی محیط کنگورد آگار (Merck، آلمان) کشت شدند و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری گردیدند. در ادامه، جهت بررسی ماندگاری و تکمیل تولید اسلایم به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند. ذکر این نکته ضرورت دارد که باکتری‌های با قدرت بالای تولید اسلایم، در محیط کنگورد آگار کلنی سیاه تشکیل می‌دهند (۱۴).

بررسی تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه‌ای

به‌منظور بررسی تشکیل بیوفیلم این باکتری، ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری (کشت تازه) به لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط مایع استریل تریپتیک سوی براث تلقیح گردید. سپس، ۱۵۰ میکرولیتر از محیط ۱۰ میلی‌لیتری به داخل چاهک‌های میکروتیتر پلیت ریخته شد. باید عنوان نمود که چاهک شاهد حاوی محیط کشت مایع استریل تریپتیک سوی براث بود. پس از تلقیح، درب پلیت گذاشته شد و گرماگذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس صورت گرفت. در ادامه، محتوای داخل چاهک‌ها خالی گردید و شستشوی چاهک‌ها سه مرتبه با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل انجام شد. به‌منظور تثبیت سلول‌ها، ۱۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد به چاهک‌ها اضافه شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، محتویات چاهک‌ها تخلیه شدند و به آن‌ها اجازه داده شد تا در دمای آزمایشگاه خشک شوند. در ادامه، هر چاهک با کریستال ویوله ۲ درصد رنگ‌آمیزی شد و پس از گذشت ۱۰ دقیقه، چاهک‌ها به آرامی با آب شهری شسته شدند و با ۱۵۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ درصد به‌عنوان حلال پر شدند. پس از ۱۵ دقیقه گرماگذاری پلیت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، جذب نوری چاهک‌های رنگ‌شده با کریستال ویوله در ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد و براساس فرمول جدول ۱، بیوفیلم قوی و متوسط گزارش گردید (۱۵).

بررسی وجود همزمان ژن‌های دخیل در بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس حاوی ژن mecA

ابتدا استخراج DNA از نمونه‌هایی که دارای بیشترین قدرت تولید بیوفیلم بودند با استفاده از روش فنل- کلروفرم انجام شد. واکنش Multiplex PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر با استفاده از مخلوط تجاری شرکت زیست فناوری پیشگام و پرایمرهای اختصاصی موجود در مقالات برای ژن‌های *mecA*، *icaA* و *icaD* (جدول ۲) و بهینه‌سازی

جدول ۱: فرمول و شاخص ارزیابی تولید بیوفیلم

Formula	Strong (S)	Moderate (M)	Weak (W)	Negative (N)
BF=AB-CW	≥۰/۳۰۰	۰/۰-۲۰۰/۲۹۹	۰/۰-۱۰۰/۱۹۹	<۰/۱۹۹

BF: Biofilm Formation AB: Stained Bacteria CW: Stained control Wells

جدول ۲: پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *mecA*، icaA و ica

ژن	پرایمر	توالی	طول توالی محصول PCR (جفت باز)	منبع
mecA	فوروارد	TGGCTATCGTGTCACAATCG	۵۳۳	۱۶
	ریورس	CTGGAACTTGTTGAGCAGAG		
icaA	فوروارد	CCTAACTAACGAAAG GTAG	۱۳۱۵	۹
	ریورس	AAGATATAGCGATAA GTGC		
icaD	فوروارد	AAACGTAAGAGAGGTGG	۳۸۱	۹
	ریورس	GGCAATATGATCAAG ATAC		

شرایط براساس برنامه دمایی مخصوص این ژن‌ها در ۳۵ سیکل تکثیر انجام شد. در ادامه، مرحله اولیه جداسازی دو رشته در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۴۰ ثانیه، مرحله جداسازی ثانویه رشته‌ها در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها در دمای ۴۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه (براساس گرادیان دما برای هر سه ژن به‌دست آمد)، مرحله طویل‌شدن رشته هدف در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و مرحله طویل‌شدن نهایی رشته‌ها در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۲۰ ثانیه صورت گرفت. لازم به ذکر است که دمای اتصال (انیلینگ) پرایمرهای محصول PCR ژن‌های مورد نظر برای ژن‌های *mecA*، *icaA* و *icaD* به‌ترتیب دربرگیرنده توالی‌های ۵۳۳، ۱۳۱۵ و ۳۸۱ جفت بازی بودند که با استفاده از روش الکتروفورز در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی روی ژل آگارز ۱/۵ درصد به‌دست آمدند.

نتایج

جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

از میان ۱۰۰ نمونه جمع‌آوری شده، ۸۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* براساس آزمون‌های بیوشیمیایی جداسازی گردید. براساس نتایج بررسی مقاومت به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین، ۶۵ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* به این آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند.

تولید اسلایم استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

در ۲۴ ساعت اولیه از میان ۶۵ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، ۴۱ نمونه (۶۳ درصد) اسلایم قوی با کلنی سیاه، ۱۴ نمونه (۲۱/۵۳ درصد) اسلایم متوسط با کلنی خاکستری و ۱۰ نمونه (۱۵/۳ درصد) اسلایم ضعیف با کلنی قهوه‌ای تولید کردند و هیچ نمونه بدون اسلایمی به‌دست نیامد. پس از گذشت ۴۸ ساعت در ۶۷ درصد از باکتری‌ها اسلایم قوی مشاهده گردید؛ اما پس از ۷۲ ساعت تغییری در نتایج حاصل نشد. این مهم نشان‌دهنده آن است که تولید اسلایم *استافیلوکوکوس اورئوس* از ۲۴ تا ۴۸ ساعت رخ می‌دهد (شکل ۱).

قدرت تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

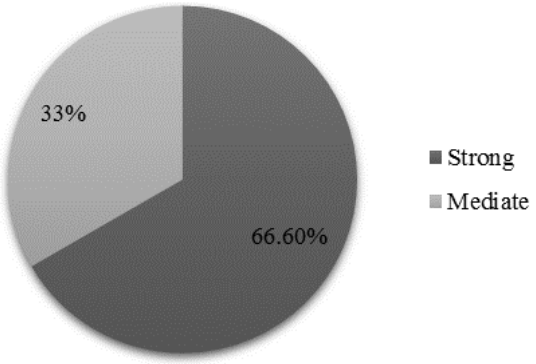
براساس یافته‌ها، ۶۵ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین قدرت تشکیل بیوفیلم را داشتند که

شکل ۱: تولید اسلایم توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط کنگو رد آگار (سمت راست) و محیط حاوی باکتری شاهد فاقد اسلایم (سمت چپ)

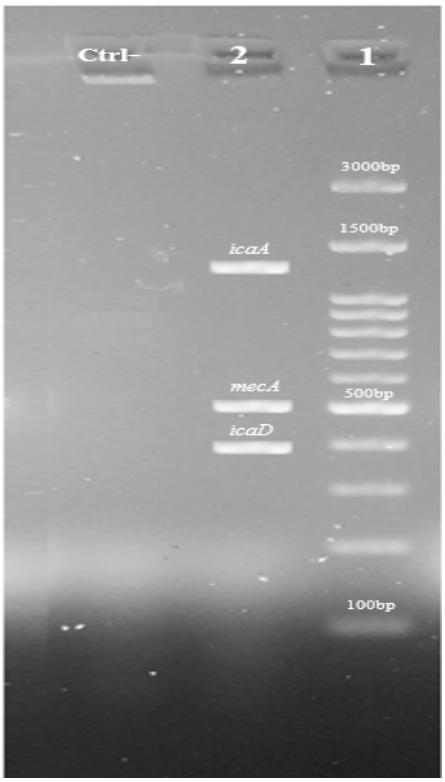
۶۶/۶ درصد از آن‌ها از توانایی تولید بیوفیلم قوی و ۳۳/۳ درصد دیگر به‌طور متوسط از توانایی تشکیل بیوفیلم برخوردار بودند (شکل ۲).

وجود همزمان ژن‌های دخیل در بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس حاوی ژن mecA

براساس یافته‌های Multiplex PCR مشخص شد که از میان ۶۵ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* که در بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به متی‌سیلین مقاوم بودند، ۶۳ نمونه (۹۶/۹۲ درصد) دارای ژن *mecA* با اندازه باند ۵۳۳ bp، ۵۸ نمونه (۸۹/۲۳ درصد) دارای ژن *icaA* با اندازه باند ۱۳۱۵ bp، ۶۱ نمونه (۹۳/۸۴ درصد) دارای ژن *icaD* با اندازه باند ۳۸۱ bp و ۵۸ نمونه (۸۹/۲۳ درصد) دارای هر سه ژن *mecA*، *icaA* و *icaD* بودند که این امر نشان‌دهنده رابطه بین این سه ژن و بیماری‌زایی می‌باشد (شکل ۳).



شکل ۲: درصد تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین



شکل ۳: الکتروفورز محصولات Multiplex PCR سه ژن *mecA*، *icaA* و *icaD*

(ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی؛ ستون ۲: *mecA* (۵۳۳ bp)، *icaA* (۱۳۱۵ bp) و *icaD* (۳۸۱ bp)؛ ستون Ctrl: شاهد حاوی تمام مواد واگنشکر بدون DNA الگو)

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در سال ۱۹۶۱ در انگلستان، یک سال پس از معرفی آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین جدا شد و در حضور متی‌سیلین به سرعت رشد کرد که این امر ناشی از افزایش رونویسی از ژن *mecA* بود که منجر به جهش نقطه‌ای در پروموتور می‌گردید (۱۷). این ژن تولید پروتئین PBP2a که میل ترکیبی کمی با آنتی‌بیوتیک‌های β-لاکتامی داشته و سبب مقاومت به آن‌ها می‌شود را کنترل می‌کند (۴،۱۷). در پژوهش حاضر از ۶۵ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* که در روش کربی- بوئر نسبت به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین مقاومت نشان دادند، ۶۳ نمونه (۹۶/۹۲ درصد) حاوی ژن *mecA* بودند. در این راستا، خوئی و همکاران طی پژوهشی در سال ۲۰۱۴ وجود ژن *mecA* در ۱۷۴ *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (۹۶/۷ درصد) را گزارش کردند (۱۶). Ba و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ با مطالعه در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس*هایی که براساس آزمایش کربی- بوئر مقاوم به متی‌سیلین بودند، مشاهده کردند که در چند نمونه از آن‌ها ژن *mecA* وجود ندارد (۱۸). نتایج پژوهش حاضر و مطالعات این پژوهشگران نشان‌دهنده صحت روش PCR در مقایسه با روش دیسک‌گذاری می‌باشند.

اسلایم نوعی پلی‌ساکارید خارج سلولی است که در اتصال، کلونیزاسیون، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و عفونت برخی از میکروارگانیسم‌ها نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس* نقش ویژه‌ای دارد (۵،۶). مطالعات نشان داده‌اند که ازبین‌بردن عفونت ناشی از باکتری‌های تولیدکننده اسلایم بسیار مشکل است و باکتری‌های تولیدکننده این اگزوپلی‌ساکارید در مقایسه با باکتری‌های بدون اسلایم نسبت به غلظت‌های بالای آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان می‌دهند (۶). نتایج پژوهش حاضر گویای آن بودند که در ۲۴ ساعت اولیه از میان ۶۵ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، ۴۱ نمونه (۶۳ درصد) اسلایم قوی با کلنی سیاه، ۱۴ نمونه (۲۱/۵۳ درصد) اسلایم متوسط با کلنی خاکستری و ۱۰ نمونه (۱۵/۳ درصد) اسلایم ضعیف با کلنی قهوه‌ای تولید کردند و هیچ نمونه بدون اسلایمی به‌دست نیامد. پس از گذشت ۴۸ ساعت در ۶۷ درصد از باکتری‌ها اسلایم قوی مشاهده شد. Kouidhi و همکاران در سال ۲۰۱۰ با استفاده از آزمون کنگو رد آگار به بررسی تولید اسلایم پرداختند و نشان دادند که ۵۵ درصد از سویه‌های آن‌ها قادر به تولید اسلایم بودند (۱۹). Shanmugarj و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶ میزان تولید اسلایم در ۴۹ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین که قدرت تشکیل بیوفیلم را داشتند، معادل ۷۷/۸ درصد گزارش نمودند (۲۰). شایان ذکر است که یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات این پژوهشگران همسویی دارد.

بیوفیلم نقش مهمی را در عفونت‌های بیمارستانی ایفا می‌کند و بیماران مستعد به عفونت‌های بیمارستانی اغلب مقاومت به چند آنتی‌بیوتیک را به‌طور همزمان کسب می‌کنند که بیشتر اوقات مربوط به آلودگی با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد (۵،۷). از آنجایی که بیوفیلم از میکروارگانیسم در برابر فاگوسیتوز و عوامل ضدمیکروبی نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها مراقبت می‌کند، تشخیص سریع سویه‌هایی که قادر به تشکیل بیوفیلم هستند و ازبین‌بردن باکتری مربوطه حائز اهمیت می‌باشد (۵،۷). در پژوهش حاضر از میان ۶۵ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، حدود ۶۶/۶ و ۳۳/۳ درصد به‌ترتیب قدرت تولید بیوفیلم قوی و متوسط را داشتند. در این راستا Shanmugaraj و همکاران در سال ۲۰۱۶، ۶۳ *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سلین را از بیماران مبتلا به فارنژیت جدا کردند که ۴۴ نمونه از آن‌ها (۶۹/۸

درصد) قادر به تولید بیوفیلم بودند (۲۰). نوربخش و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶ میزان تشکیل بیوفیلم قوی در ۱۰۳ *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک را ۵۳/۳ درصد گزارش کردند (۲۱).

تولید اسلایم نیز همانند تولید بیوفیلم تحت کنترل ژن‌های *icaA* و *icaD* که بر روی اپرون *ica* واقع شده‌اند، می‌باشد و اگرچه وجود ژن *icaA* در ابتدای بیوسنتز پلی‌ساکارید خارج سلولی بسیار مؤثر است؛ اما بیان همزمان ژن *icaD* برای تولید میزان کافی از این پلی‌ساکارید به‌منظور تشکیل بیوفیلم ضروری می‌باشد (۶،۲۲). در پژوهش حاضر ۸۹/۲۳ و ۹۳/۸۴ درصد از *استافیلوکوکوس اورئوس*های مقاوم به متی‌سیلین به‌ترتیب دارای ژن‌های *icaA* و *icaD* بودند و سه ژن *mecA*، *icaA* و *icaD* در ۸۹/۲۳ درصد از آن‌ها مشاهده شد. در این ارتباط، Satorres و همکاران طی پژوهشی در سال ۲۰۰۷ وجود همزمان دو ژن *icaA* و *icaD* و ضرورت نقش آن‌ها در تولید اسلایم *استافیلوکوکوس اورئوس* را گزارش نمودند (۱۴). Gad و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹ بیان کردند که *استافیلوکوکوس اورئوس*های تشکیل‌دهنده بیوفیلم دارای هر دو ژن *icaA* و *icaD* می‌باشند (۲۳). از سوی دیگر، خاشعی و همکاران طی پژوهشی در سال ۲۰۱۵ وجود همزمان سه ژن *mecA*، *icaA* و *icaD* در *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین را گزارش کردند و اعلام نمودند که دو ژن *icaA* و *icaD* نقشی ضروری در تولید بیوفیلم این باکتری دارند (۲۴).

نتیجه‌گیری

براساس نتایج این پژوهش می‌توان گفت که تولید اسلایم و تشکیل بیوفیلم توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین حاوی ژن *mecA* نقش مؤثری در بیماری‌زایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری دارند. همچنین، حضور همزمان دو ژن اصلی اتصالی *icaA* و *icaD* در این باکتری می‌تواند درمان آن را دشوار سازد و در صورتی که بتوان بیان این دو ژن و سایر ژن‌های دخیل در اتصال این باکتری را مهار کرد، می‌توان به نتایج مطلوبی برای مبارزه با عفونت‌های ناشی از آن دست یافت.

حمایت مالی

پژوهش حاضر حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی بوده و با حمایت واحد پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

پس از هماهنگی با بخش نمونه‌گیری بیمارستان مورد مطالعه، اقدام به نمونه‌گیری گردید.

تضاد منافع

تمامی نویسندگان این مقاله رضایت کامل برای انتشار آن دارند و هیچ‌گونه تضاد منافعی بین آن‌ها گزارش نشده است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات جناب آقای مهندس نوشیری؛ کارشناس محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان که پژوهشگران را در راستای انجام این پژوهش یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

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; 18(1):130.
2. Aung KT, Hsu LY, Koh TH, Hapuarachchi HC, Chau

ML, Gutiérrez RA, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in retail food in Singapore. Antimicrob Resist Infect Control. 2017; 6:94.
3. Zh XY, Zhu QY. Evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: evidence of positive selection in a penicillin-binding protein (PBP) 2a coding gene mecA. Infect Genet Evol. 2018; 59:16-22.
4. Bohlouli P, Nahaei MR, Farajnia S, Varshochi M, Ghojazadeh M, Akbari Dibavar M, et al. Cassette chromosome mec typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates collected from Sina and Imam Reza hospitals of Tabriz. Med J Tabriz Univ Med Sci Health Ser. 2016; 38(4):12-21. [in Persian]
5. McCarthy H, Rudkin JK, Black NS, Gallagher L, O'Neill E, O'Gara JP. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in Staphylococcus aureus. Front Cell Infect Microbiol. 2015; 5:1.
6. Ciftci A, Findik A, Onuk EE, Savasan S. Detection of methicillin resistance and *slime* factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. Braz J Microbiol. 2009; 40(2):254-61.
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. Rohde H, Frankenberger S, Zahringer U, Mack D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesion (PIA) to Staphylococcus epidermidis biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. Eur J Cell Biol. 2010, 89(1):103-11
9. Pozzi C, Waters EM, Rudkin JK, Schaeffer C, Lohan AJ, Tong P, et al. Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. PLoS Pathog. 2012; 8(4):e1002626.
10. Oyama T, Miyazaki M, Yoshimura M, Takata T, Ohjimi H, Jimi S. Biofilm-forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* survive in kupffer cells and exhibit high virulence in mice. Toxins (Basel). 2016; 8(7):E198.
11. Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. Front Cell Infect Microbiol. 2015; 5:7.
12. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates. J Clin Microbiol. 2005, 43(4):1973-6.
13. Diemond-Hernández B, Solórzano-Santos F, Leaños-Miranda B, Peregrino-Bejarano L, Miranda-Novales G. Production of icaADBC encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in paediatric patients with staphylococcal device-related infections. BMC Infect Dis. 2010; 10(1):68.
14. Satorres SE, Alcaráz LE. Prevalence of icaA and icaD genes in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis strains isolated from patients and hospital staff. Cent Eur J Public Health. 2007; 15(2):87-90.
15. Bimanand L, Taherikalani M, Jalilian FA, Sadeghifard N, Ghafourian S, Mahdavi Z, et al. Association between biofilm production, adhesion genes and drugs resistance in different SCCmec types of methicillin resistant Staphylococcus aureus strains isolated from several major hospitals of Iran. Iran J Basic Med Sci. 2018; 21(4):400.
16. Khoei F, Mobaiyen H, Nahaei MR, Sadeghi Mohammadi S. Antibiotic resistance pattern and frequency of mecA Gene in Staphylococcus aureus Isolated from Shohada Hospital, Tabriz. J Med Microbiol Infect Dis. 2014; 2(3):105-8.
17. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect. 2007; 13(3):222-35.
18. Ba X, Harrison EM, Edwards GF, Holden MT, Larsen AR, Petersen A. Novel mutations in penicillin-binding protein genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates that are methicillin resistant on susceptibility testing, but lack the *mec* gene. J Antimicrob Chemother. 2014; 69(3):594-7.
19. Kouidhi B, Zmantar T, Hentati H, Bakhrouf A. Cell surface hydrophobicity, biofilmformation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in Staphylococcus aureus associated to dental caries. Microbial Pathog. 2010; 49(1-2):14-22.
20. 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 Res Int. 2016; 2016:1289157.
21. Nourbakhsh F, Namvar AE. Detection of genes involved in biofilm formation in Staphylococcus aureus isolates. GMS Hyg Infect Control. 2016; 11:Doc07.
22. O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Rabinson DA, et al. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in Staphylococcus aureus isolates from device-related infections. J Clin Microbiol. 2007; 45(5):1379-88.
23. Gad GF, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H, El-Baky RM. Detection of icaA, icaD genes and biofilm production by Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis isolated from

urinary tract catheterized patients. J Infect Dev Ctries. 2009; 3(5):342-51.

24. Khashei R, Ebrahim-Saraie H, Motamedifar M, Zalipour M, Sarvari J. Detection of icaA/icaD genes and biofilm formation among clinical isolates of Staphylococcus aureus from Shiraz, Iran. J Med Bacteriol. 2015; 4(1):35-42.

Volume 21, Issue 67, Autumn 2018, Pages: 10-19

Original Article

Study of Biofilm and Slime Formation Coded by *icaA* and *icaD* Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* containing *mecA* gene in Shahrud County, Iran during 2017-2018

Nazila Arbab Soleimani[1*], Marmar Valikhani[2], Elahe Tajbakhsh[3]

[1] Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran
[2] MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran
[3] Associate Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

Received: 07 October 2018 **Accepted:** 06 November 2018

Abstract

Introduction: Currently, scientists hold the conviction that attachment and biofilm formation are the initial factors in bacterial pathogenesis. The present study aimed to investigate the coexistence of *icaA* and *icaD* genes involved in the slime and biofilm production of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing *mecA* gene and their relations to its pathogenesis.
Materials and Methods: In this descriptive cross-sectional study, 100 wound samples were collected from one of Shahruod hospiltals in 2017. The isolation and purification of *Staphylococcus aureus* was performed. It should be noted that resistance to methicillin was investigated by Kirby-Bauer test. The study of slime production and biofilm formation were carried out using Congo red-agar and 96 microtiter plate-based methods, respectively. The examination of the relationship between *mecA*, *icaA*, and *icaD* genes was performed by Multiplex polymerase chain reaction.
Results: In this study, 65 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* samples were isolated of which 67% and 66.6% were able to form strong slimes with black colonies and strong biofilms, respectively. The coexistence of *mecA*, *icaA*, and *icaD* in 89.23 of the samples was observed.
Conclusion: According to the results of the present study, there was a relation between pathogenesis and antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, which should be considered for the treatment of the infection caused by this bacterium.

Keywords: Biofilm, *icaA* gene, *mecA* gene, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Slime

**** Corresponding Author:*** Nazila Arbab Soleimani, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran. Tel : 02188876808; Email: nazilaarbab@yahoo.co.uk