



Investigation of antibacterial resistance and biofilm production capacity of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* in Guilan

Ahmadreza Sahranavard ¹, Leila Asadpour ²

¹ Msc, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic azad University, Rasht, Iran.

² Associate Professor, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic azad University, Rasht, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Staphylococcus epidermidis* is a member of the microbiota of human skin, respiratory system and gastrointestinal tract which its the most important virulence factor is the ability to form biofilms. The aim of this study was to investigate antibacterial resistance and investigation of biofilm production in clinical isolates of *S. epidermidis* in Guilan.

Materials & Methods: *S. epidermidis* were isolated from clinical specimens in Rasht. Antibiotic resistance of isolates was evaluated by disk diffusion method and phenotypic evaluation of biofilm production capability by microplate method. The presence of genes involved in biofilm formation including *icaA*, *icaD*, *bhp* and *aap* was investigated by PCR.

Results: Out of 70 isolated *Staphylococcus epidermidis*, the highest resistance was against penicillin and vancomycin was the most effective antibiotic. In phenotypic assay, 38 isolates (54.3%) were able to produce biofilm, of which 94.7%, 55.3% and 42.1%, presence of *icaA*, *icaD* and *aap* genes were detected respectively. The *bhp* gene was not detected in the studied isolates.

Conclusion: The results indicate high rate of antibacterial resistance and biofilm forming ability in *S. epidermidis* isolates in Guilan and as a result the high potential of these isolates in colonization, pathogenicity and acquisition of multidrug resistance.

Keywords: *Staphylococcus epidermidis*, Antibacterial resistance, Biofilm, *icaA*, *icaD*, *bhp*, *aap*.

Received: 24 June 2021

Revised: 18 October 2021

Accepted: 23 November 2021

Correspondence to: Leila Asadpour

Tel: +98 9113383860

E-mail: l.asadpour@yahoo.com

Journal of Microbial World 2021, 14(3): 16-25

DOI:10.30495/jmw.2021.690442



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و قابلیت تولید بیوفیلم جدایه‌های بالینی استافیلوکوکوس

اپیدرمیدیس در گیلان

احمدرضا صحرانورد^۱، لیلا اسدپور^{۲*}

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

^۲ دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از اعضای فلور طبیعی پوست انسان، سیستم تنفسی و دستگاه گوارش است که مهم‌ترین فاکتور بیماری‌زایی آن توانایی تشکیل بیوفیلم است. هدف از این مطالعه بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و قابلیت تولید بیوفیلم در جدایه‌های بالینی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در گیلان است.

مواد و روش‌ها: جدایه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از نمونه‌های بالینی در رشت جداسازی شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها به روش انتشار از دیسک و بررسی فنوتیپی قابلیت تولید بیوفیلم به روش میکروپلیت مورد ارزیابی قرار گرفت. حضور ژن‌های موثر در تشکیل بیوفیلم شامل *icaA*، *icaD*، *bhp* و *aap* به روش PCR بررسی شد.

یافته‌ها: از بررسی ۷۰ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، بیشترین میزان مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و موثرترین آنتی‌بیوتیک ونکومايسین بود. در بررسی فنوتیپی، ۳۸ جدایه (۵۴/۳ درصد) قابلیت تولید بیوفیلم داشتند که از این تعداد به ترتیب در ۹۴/۷ درصد، ۵۵/۳ درصد و ۴۲/۱ درصد از جدایه‌ها حضور ژن‌های *icaA*، *icaD* و *aap* شناسایی شد. در هیچ‌کدام از جدایه‌های مورد بررسی ژن *bhp* شناسایی نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه بیانگر مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا و قابلیت تولید بیوفیلم در جدایه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در گیلان و در نتیجه پتانسیل بالای این جدایه‌ها در کلونیزه شدن، بیماری‌زایی و کسب مقاومت‌های دارویی چندگانه می‌باشد.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بیوفیلم، *aap*، *bhp*، *icaD*، *icaA*.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۹/۲

ویرایش مقاله: ۱۴۰۰/۷/۲۶

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۴/۳

مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی بوده در شرایط خاصی می‌توانند باعث ایجاد بیماری به ویژه در بیماران با نقص ایمنی شوند (۱ و ۲). این باکتری‌ها شامل چندین گونه هستند که از نظر اپیدمیولوژی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بیماری‌زایی با یکدیگر تفاوت دارند. استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس

استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی فراوان‌ترین فلور میکروبی ساکن پوست و غشاهای مخاطی هستند که از عوامل شایع

* آدرس برای مکاتبه: گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

پست الکترونیک: lasadpour@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۱۳۳۸۳۸۶۰



در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس پلی ساکارید عامل چسبندگی بین سلولی (Polysaccharide intercellular adhesion) PIA که توسط اپرن *ica* تولید می‌شود، موجب اتصال سلول به سلول و تنظیم تشکیل بیوفیلم می‌گردد. مطالعات حاکی از این است که *icaA* نقش مهمی در تولید بیوفیلم توسط استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ایفا می‌کند.

مولکول دیگر (Bap homologous protein) Bhp که مشابه Bap (biofilm associated protein) در استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد در برخی سویه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بیان می‌شود و در اتصال بیوفیلم نقش ایفا می‌کند. همچنین Aap (Accumulation association protein) یک پروتئین خارج سلولی ۱۴۰ کیلودالتونی است که سبب تجمع باکتری در سطوح پلیمری و تشکیل بیوفیلم می‌شود (۹ و ۷).

مصرف آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف در بیمارستان‌ها و فشار انتخابی ناشی از مصرف بی‌رویه آن‌ها، زمینه بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان پاتوژن‌های بیمارستانی از جمله استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی را فراهم نموده است. بر اساس نتایج تحقیقات گذشته استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس نسبت به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی درمان عفونت‌ها، از جمله پنی سیلین، آگراسیلین، اریتروماسین، کلیندامایسین مقاومت دارد.

فراوانی این مقاومت‌ها در بین جدایه‌های بالینی مختلف و در مناطق مختلف جغرافیایی، بسیار متفاوت بوده و به سرعت در حال گسترش است (۱۱ و ۱۰).

با توجه به اینکه افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میکروب‌های بیماری‌زا از جمله استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، مشکلات فراوانی را در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری ایجاد کرده است و به دلیل اهمیت تشکیل بیوفیلم بر بروز مقاومت‌های دارویی و افزایش حدت باکتری، مطالعه حاضر با هدف بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی قابلیت تولید بیوفیلم در جدایه‌های بالینی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و مقایسه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های مولد بیوفیلم با جدایه‌های بیوفیلم منفی انجام شد.

Staphylococcus epidermidis) غالب‌ترین گونه از استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی در ارتباط با عفونت‌های حاصل از سوندگذاری، جراحی مفصل، پروتز و عفونت‌های بیمارستانی است. عامل مهم و کلیدی در بیماری‌زایی این گونه، کلونیزه شدن و تشکیل بیوفیلم چندلایه است (۳ و ۱). بیوفیلم بیانگر یک جامعه میکروبی است که در آن ارتباطات درونی بین گروه‌های مختلف وجود دارد. بیوفیلم می‌تواند از یک گونه و یا گونه‌های مختلف میکروبی تشکیل شود و شامل باکتری‌ها در یک ماتریکس پلی ساکاریدی، پروتئین و اسید نوکلئیک باشد که به طور قابل توجهی سبب افزایش پایداری باکتری‌ها در محیط و محافظت آن‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و عملکرد سیستم ایمنی میزبان می‌گردد؛ در نتیجه یک عامل مهم در توسعه عفونت مزمن و عودشونده به شمار می‌رود (۴ و ۳). بیوفیلم در دو مرحله تشکیل می‌شود: ابتدا استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به ماتریکس پروتئینی در وسایل و سطوح متصل شده سپس انباشته شدن باکتری‌ها در لایه‌های مختلف و تشکیل گلیکوکالیکس انجام می‌گیرد که منجر به تشکیل بیوفیلم بالغ می‌شود (۶ و ۵).

بر اساس گزارش‌ها، مقاومت باکتریایی در فاز بیوفیلم ۱۰۰۰ بار بیشتر از حالت پلانکتونی یا رشد آزاد همان باکتری است. مکانیسم‌های متعددی در ایجاد این مقاومت نقش دارند. ایجاد سد فیزیکیوشیمیایی به وسیله ماتریکس پلی‌ساکاریدی و ممانعت از نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها، سطح پایین فعالیت متابولیکی باکتری‌ها در بیوفیلم، توقف تکثیر و رشد باکتریایی به دلیل دسترسی کمتر باکتری‌ها به مواد مغذی و اکسیژن در قسمت‌های عمقی بیوفیلم از جمله این مکانیسم‌ها هستند. همچنین ایجاد یک محیط شیمیایی تغییر یافته درون بیوفیلم؛ به عنوان مثال تولید محصولات اسیدی در بیوفیلم، ممکن است با تغییر pH در فضای داخلی بیوفیلم همراه بوده و باعث تغییر در عملکرد آنتی‌بیوتیک شود (۱). بیوفیلم اجازه چسبندگی و ماندگاری باکتری‌ها را در درون خود می‌دهد. علاوه بر این باکتری‌ها در بیوفیلم به صورت سازمان یافته‌ای در برابر عوامل ضد میکروبی و سیستم ایمنی بدن میزبان محافظت می‌شوند (۷).

مواد و روش‌ها

نچسبیده‌اند جدا شوند. در مرحله بعد، سایر باکتری‌هایی که به چاهک چسبیده‌اند با استفاده از ۲۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ثابت شدند. بعد از آن هر چاهک با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۰۲ درصد رنگ آمیزی شد و بعد از ۵ دقیقه رنگ با آب مقطر شستشو داده شد. بعد از خشک شدن پلیت‌ها، آنالیز کمی بیوفیلم با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر از گلاسیال استیک اسید ۳۳ درصد به هر چاهک و خواندن OD آن‌ها در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر محاسبه شد. در ارزیابی بیوفیلم تشکیل شده براساس میزان جذب نوری، نمونه‌های با OD کمتر از ۰/۱ فاقد بیوفیلم، ۰/۲-۰/۱ به عنوان بیوفیلم ضعیف، ۰/۳-۰/۲ به عنوان بیوفیلم متوسط و بیش از ۰/۳ به عنوان بیوفیلم قوی ارزیابی شدند (۱). سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ATCC 35984 به عنوان کنترل مثبت و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ATCC 12228 به عنوان کنترل منفی تشکیل بیوفیلم استفاده شدند.

د) استخراج DNA و بررسی فراوانی ژن‌های بیوفیلم: برای استخراج DNA از کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم مثبت شرکت سیناژن (Cat. No. PR88161) استفاده گردید. پرایمر اختصاصی ژن‌های *icaA/D*, *bhp*, *aap* با توالی گزارش شده توسط Abbondio و همکاران در سال ۲۰۱۹ به صورت لیوفیلیزه از شرکت متابون (آلمان) تهیه گردید (۱۳). توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است. اسیدنوکلیک استخراج شده در واکنش PCR به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل dNTPs (۱۰ میلی-مول) ۰/۵ میکرولیتر، بافر آنزیم (10X) ۵ میکرولیتر، پرایمرهای پیشرو و پیرو (۱۰ پیکومول) ۳ میکرولیتر، DNA الگو (۲ میکروگرم) ۲ میکرولیتر، آنزیم (۲/۵ واحد) ۰/۵ میکرولیتر، آب مقطر ۱۴ میکرولیتر انجام گرفت. برنامه حرارتی ترموسایکلر به ترتیب شامل مراحل واسرشته شدن اولیه در ۹۴ درجه به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی ۹۴ درجه ۱ دقیقه، ۵۷ درجه ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه ۱ دقیقه بود. سپس یک مرحله ده دقیقه‌ای طویل شدن نهایی اضافه گردید و محصول PCR بر

الف) جدایه‌های مورد مطالعه: جدایه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در ۶ ماه اول سال ۹۹ از نمونه‌های بالینی در آزمایشگاه‌های مختلف تشخیص طبی شهر رشت جمع‌آوری و به آزمایشگاه واحد منتقل گردید. برای تایید تشخیص و خالص سازی باکتری‌ها تست‌های بیوشیمیایی شامل کاتالاز، Dnase و کوآگولاز انجام شد. همچنین کشت بر روی محیط مانیتول سالت آگار، بررسی حساسیت جدایه‌ها به نوویوسین به روش انتشار از دیسک و خاصیت رنگ پذیری و مرفولوژی باکتری در زیر میکروسکوپ بررسی شد. سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ATCC 35984 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

ب) بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها: به منظور تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های بالینی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس تست آنتی‌بیوگرام به روش انتشار دیسک طبق دستور کار CLSI انجام گرفت. دیسک آنتی‌بیوتیک‌های کلیندامایسین (۲μg)، سفالکسین (۳۰μg)، سفوکسیتین (۳۰μg)، پنی سیلین (۱۰μg)، آموکسی سیلین (۲۵μg)، داکسی سیکلین (۳۰μg)، مینوسیکلین (۳۰μg)، تتراسیکلین (۳۰μg)، نیتروفورنتوئین (۳۰۰μg)، ونکومایسین (۳۰μg)، کوتریموکسازول (۷۵/۲۳μg)، ازیترومایسین (۱۵μg)، اریترومایسین (۱۵μg)، کلاریترومایسین (۱۵μg)، ریفامپین (۵μg)، سیپروفلوکساسین (۵μg) و اگزاسیلین (۱μg) از شرکت پادتن طب تهیه گردید. میزان مقاومت یا حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد بر روی محیط آگار مولر هیتون (مرک، آلمان) و تعیین کم‌ترین غلظت مهار کننده رشد (ونکومایسین) تعیین گردید (۱۲).

ج) ارزیابی فنوتیپی قابلیت تولید بیوفیلم جدایه‌ها: برای بررسی قدرت تشکیل بیوفیلم ابتدا از جدایه‌ها در محیط تریپتیکاز سوی برات (مرک، آلمان) حاوی ۱ درصد گلوکز سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند تهیه، سپس به هر چاهک الیزا ۱۰۰ میکرولیتر از این کشت اضافه و میکروپلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از گرمخانه‌گذاری، چاهک‌ها سه بار با PBS شستشو شدند تا باکتری‌هایی که

بیشترین میزان مقاومت جدایه‌های مولد بیوفیلم به آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین (۸۱/۶ درصد) و اریترومايسين (۸۱/۶ درصد) بود. در گروه بیوفیلم منفی نیز بیشترین میزان مقاومت نسبت به پنی سیلین (۷۸/۱ درصد) و آزیترومایسین (۷۵ درصد) مشاهده شد. آنتی‌بیوتیک‌های ونکومايسين، سفوکسیتین و مینوسایکلین در هر دو گروه، موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها بودند. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه به طور معنی‌داری در گروه مولد بیوفیلم بیشتر از باکتری‌های بیوفیلم منفی بود ($P \leq 0/05$). فراوانی و درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه به تفکیک تولید و عدم تولید بیوفیلم در جدایه‌ها در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲: مقاومت جدایه‌های/استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه.

| آنتی‌بیوتیک (غلظت) | مولد بیوفیلم (تعداد (درصد مقاومت)) | بیوفیلم منفی (تعداد (درصد مقاومت)) | P- value |
|--------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------|
| کوآکسی‌کازول | ۲۴ (۶/۳۳) | ۱۸ (۲/۵۶) | . |
| اگزاسیلین | ۲۰ (۰/۶۵۲) | ۱۲ (۵/۳۷) | . |
| پنی سیلین | ۳۱ (۶/۸۱) | ۲۵ (۱/۷۸) | . |
| آموکسی سیلین | ۲۵ (۸/۶۵) | ۲۰ (۵/۶۲) | . |
| سفالکسین | ۱۴ (۸/۳۶) | ۱۱ (۴/۳۴) | . |
| سفوکسیتین | ۸ (۱/۲۱) | ۵ (۶/۱۵) | ۰۰۱/۰ |
| مینوسیکلین | ۸ (۱/۲۱) | ۶ (۸/۱۸) | ۰۰۱/۰ |
| تتراسیکلین | ۲۷ (۱/۷۱) | ۱۶ (۵/۰) | . |
| داکسی سیکلین | ۱۷ (۷/۴۴) | ۱۴ (۸/۴۳) | . |
| آزیترومایسین | ۲۹ (۳/۷۶) | ۲۴ (۷/۵) | . |
| اریترومايسين | ۳۱ (۶/۸۱) | ۲۳ (۹/۷۱) | . |
| کلاریترومایسین | ۲۸ (۷/۷۳) | ۲۰ (۵/۶۲) | . |
| ونکومايسين | ۴ (۵/۱۰) | . | . |
| سیپروفلوکساسین | ۲۴ (۲/۶۳) | ۱۸ (۲/۵۶) | . |
| نیتروفورانترین | ۲۰ (۶/۵۲) | ۱۳ (۶/۴۰) | . |
| ریفامپین | ۹ (۷/۲۳) | ۶ (۸/۱۸) | . |
| کلیندامایسین | ۲۳ (۵/۶۰) | ۱۵ (۹/۴۶) | . |

د) بررسی فراوانی ژن‌های *icaA/D*, *bhp*, *aap* در جدایه‌ها: از تکثیر ژن‌های *icaA*, *icaD*, *bhp* و *aap* در واکنش PCR، از ۳۸

روی ژل آگارز ۱ درصد الکترو فورز و با تعیین توالی تایید گردید.

جدول ۱: نام و توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

| منبع | طول (جفت باز) | توالی نوکلئوتیدی پرایمر | نام ژن |
|------|---------------|--|-------------|
| 13 | 502 | CACGTGCTCTATGCTGGATG CCGTTGGATATTGCCTCTGT | <i>icaA</i> |
| 13 | 290 | AGAGGCAATATCCAACGGT TCATATGTCACGACCTTTCT | <i>icaD</i> |
| 13 | 935 | TGGTATTAGGAAGCTCTCA ATACCAGCGTGACGCAAATC | <i>bhp</i> |
| 13 | 399 | ATACAACGGTGCAGATGGTTG GTAGCCGTCCAAGTTTACCAG | <i>aap</i> |

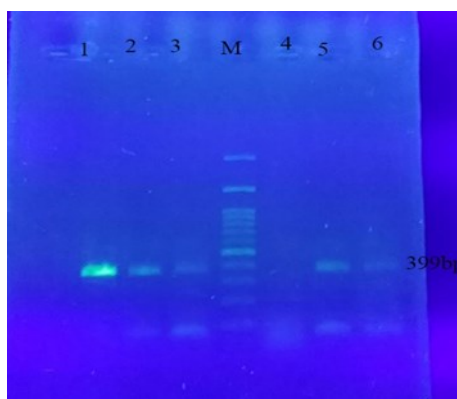
ه) آنالیز آماری: اختلاف مقاومت آنتی‌بیوتیکی در دو گروه مولد/غیر مولد بیوفیلم با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری کای اسکوائر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. $P \leq 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

الف) جداسازی باکتری: در این بررسی ۷۰ جدایه از باکتری‌های کوکسی گرم مثبت، کاتالاز مثبت، کوآگولاز منفی با کلنی‌های سفید رنگ در سطح آگار، حساس به نوویوسین، غیر تخمیر کننده مانیتول در محیط مانیتول سالت آگار به عنوان استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس شناسایی شد. این جدایه‌ها از نمونه‌های بالینی مختلف شامل ادرار (۴۰ جدایه)، ضایعات جلدی (۱۵ جدایه)، خون (۱۲ جدایه)، مایع مفصلی (۲ جدایه) و ترشحات گوش (۱ جدایه) تهیه شده بودند.

ب) بررسی تولید بیوفیلم در جدایه‌ها: در بررسی فنوتیپی قابلیت تشکیل بیوفیلم، ۳۸ جدایه (۵۴/۳ درصد) توانایی تولید بیوفیلم داشتند. از این تعداد، ۱۲ جدایه (۱۷/۱ درصد) بیوفیلم ضعیف، ۹ جدایه (۱۲/۹ درصد) بیوفیلم متوسط و ۱۷ جدایه (۲۴/۳ درصد) بیوفیلم قوی تولید نمودند.

ج) بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها: در این بررسی



شکل ۳: الکتروفورز محصول PCR ژن *aap*. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون‌های ۱-۳ و ۶ نمونه‌های *aap* مثبت، ستون ۴ نمونه منفی *aap*.

بحث

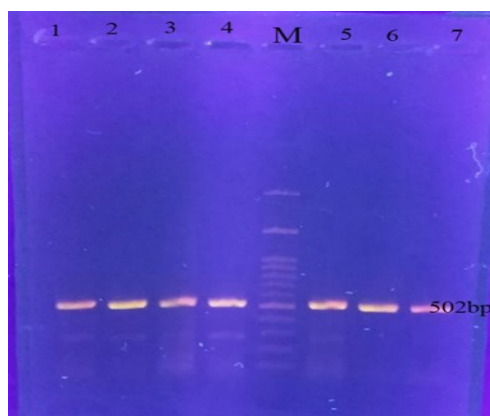
استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی از جمله فراوان‌ترین میکروارگانیسم‌های جداسازی شده از نمونه‌های بالینی در آزمایشگاه‌ها هستند. به دلیل حضور این باکتری‌ها به‌عنوان فلور طبیعی پوست و غشاهای مخاطی انسان، پیش‌تر جداسازی آن‌ها از نمونه‌های بیماران به‌عنوان آلودگی کشت در نظر گرفته می‌شد، درحالی‌که در دهه‌های اخیر این باکتری‌ها به‌عنوان عوامل بیماری‌زا، اهمیت زیادی پیدا کرده‌اند که از باکتری‌می، اندوکاردیت، عفونت زخم و عفونت مجاری ادراری به دفعات جدا شده‌اند و عامل سایر عفونت‌های مهم نظیر پنومونی و عفونت پوست و بافت نرم نیز بوده‌اند (۱۴ و ۱۵). یکی از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی این باکتری، توانایی در اتصال به مخاطات، سطوح، مواد و تجهیزات بیمارستانی و متعاقب آن ایجاد بیوفیلم است (۱).

در مطالعه حاضر مقاومت آنتی‌بیوتیکی و قابلیت تولید بیوفیلم در ۷۰ جدایه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بررسی گردید. در این بررسی ونکومايسين، سفوکسیتین، مینوسیکلین در هر دو گروه بیوفیلم منفی و مولد بیوفیلم موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها بودند. بیشترین میان مقاومت نیز نسبت به پنی سیلین و ماکرولیدهای اریترومايسين و آزیترومايسين مشاهده گردید.

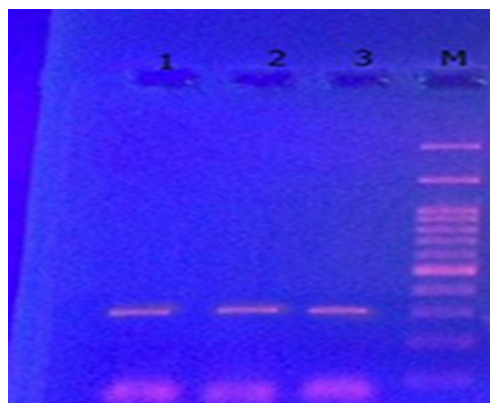
در هم‌سویی با نتایج حاضر، در مطالعه‌ی انجام شده توسط Oscoei و همکاران در سال ۲۰۱۳، نیز آنتی‌بیوتیک‌های

جدایه‌ای که در تست فنوتیپی مولد بیوفیلم شناسایی شده بودند به ترتیب در ۳۶ جدایه (۹۴/۷ درصد)، ۲۱ جدایه (۵۵/۳ درصد) و ۱۶ جدایه (۴۲/۱ درصد) حضور ژن‌های *icaD*، *icaA* و *aap* شناسایی شد و محصولات به طول تقریبی ۵۰۲، ۲۹۰ و ۳۹۹ جفت باز تولید گردید. در هیچ‌کدام از جدایه‌های مورد بررسی ژن *bhp* شناسایی نشد. در ۱۷ جدایه تولیدکننده قوی بیوفیلم حضور همزمان ژن‌های *icaAD* و در ۱۵ جدایه حضور هر سه ژن *icaD*، *icaA* و *aap* شناسایی شد.

همچنین در جدایه‌هایی که از نظر فنوتیپی بیوفیلم منفی بودند ژن‌های مورد بررسی حضور نداشتند. الکتروفورز محصول PCR ژن‌های *icaD*، *icaA* و *aap* در شکل‌های ۱-۳ نشان داده شده است.



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن *icaA*. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون‌های ۱-۷ نمونه‌های *icaA* مثبت.



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR ژن *icaD*. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون‌های ۱-۳ نمونه‌های *icaD* مثبت.

مقاومت به اگزاسیلین ۷۲/۹ درصد گزارش شد (۱۹ و ۲۰).

همچنین در مطالعه حاضر در بررسی فوتیپی، ۳۸ جدایه (۵۴/۳ درصد) قابلیت تولید بیوفیلم داشتند و ۲۴/۳ درصد آن‌ها تولید کننده قوی بیوفیلم بودند.

ژن‌های *icaA* در ۳۶ جدایه (۹۴/۷ درصد)، *icaD* در ۲۱ جدایه (۵۵/۳ درصد) و *aap* در ۱۶ جدایه (۴۲/۱ درصد) جدایه‌های مولد بیوفیلم شناسایی شدند.

توانایی تشکیل بیوفیلم جدایه‌های مورد مطالعه ما کم تر از مقدار گزارش شده توسط دادگر و همکاران (۹۷) است که قابلیت تولید بیوفیلم در جدایه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس را ۷۹/۶۷ درصد گزارش داده بودند. از نظر فراوانی ژن *icaA* در جدایه‌های مولد بیوفیلم، نتایج دو مطالعه هم‌خوانی دارد ولی فراوانی *icaD* در جدایه‌های مطالعه حاضر بیشتر است (۱).

در مطالعه Najjar-Peerayeh و همکاران در سال ۲۰۱۶ نیز ۶۱ درصد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مولد بیوفیلم بودند و ۸۸/۹ درصد واجد ژن *icaA*، ۷۲/۲ درصد واجد ژن *aap* و ۱۹/۴ درصد واجد ژن *bhp* بودند (۸). فراوانی دو ژن *aap* و *php* بیشتر از موارد شناسایی شده در پژوهش حاضر بود (۸).

در مطالعه حاضر مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در دو گروه مولد بیوفیلم و بیوفیلم منفی مقایسه گردید و مقاومت به همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی به طور معنی‌داری در گروه مولد بیوفیلم بیشتر از سویه‌های بیوفیلم منفی بود ($P \leq 0/05$). در دو مطالعه تهران و شیراز نیز همانند مطالعه حاضر، مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های مولد بیوفیلم استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بیشتر از سویه‌های بیوفیلم منفی بود (۲۲ و ۲۱). در مطالعه دادگر و همکاران نیز سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک توانایی بیشتری در تولید بیوفیلم نشان دادند (۱). نتایج مشابهی در مطالعه Shal و همکاران (۲۰۱۴) در ترکیه گزارش گردید که ۱۰۰ درصد جدایه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس تولید کننده بیوفیلم قوی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه داشتند و اغلب مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام بودند (۲۳).

ونکومایسین و ریفاپمپین بالاترین اثر ضد میکروبی را بر استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی نشان دادند. همچنین این محققین نیز بیشترین مقاومت جدایه‌های مورد بررسی را نسبت به پنی‌سیلین (۱۰۰ درصد) گزارش نمودند (۱۶). همچنین در پژوهشی که توسط Shrestha و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام شد، بیشترین حساسیت نسبت به ونکومایسین (۱۰۰ درصد) و بالاترین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین (۹۰ درصد) و کوتریموکسازول (۶۰ درصد) به دست آمد (۱۷). مقاومت بالا به اریترومایسین که در جدایه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مطالعه حاضر شناسایی شد هم در مطالعات مختلف گزارش گردید (۱۱ و ۱۷ و ۱۸). بروز و افزایش مقاومت استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی به متی‌سیلین و بتالاکتام‌ها، سبب جایگزینی ماکرولیدها و استرپتوگرامین‌ها به عنوان خط دوم درمانی شده است. فشار انتخابی ناشی از استفاده بی‌رویه از این آنتی‌بیوتیک‌ها زمینه مقاومت به گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی از جمله ماکرولیدها را فراهم نموده است (۱۱). علاوه بر مقاومت سطح بالا به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و ماکرولیدی، درصد بالایی از جدایه‌های مطالعه حاضر، مقاوم به سیپروفلوکساسین و کلیندامایسین بودند. استفاده گسترده از این آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های مختلف می‌تواند دلیل افزایش مقاومت باکتری‌ها نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها باشد.

همچنین در مطالعه حاضر از ۷۰ جدایه مورد بررسی ۴ جدایه مقاوم به ونکومایسین شناسایی شد و ۴۵/۷ درصد جدایه‌ها مقاوم به اگزاسیلین بودند. میزان مقاومت به اگزاسیلین در مطالعه حاضر کم تر از مقادیر گزارش شده در مطالعات پیشین است که با توجه به متفاوت بودن الگوی مقاومت‌ها در مناطق مختلف جغرافیایی قابل توجیه است اما ظهور سویه‌های مقاوم به ونکومایسین در جدایه‌های بالینی حاضر قابل تأمل است. در مقایسه با نتایج حاضر، در مطالعه نوربخش و ممتاز در سال ۱۳۹۵ در اصفهان همه جدایه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس حساس به ونکومایسین بوده و ۵۴ درصد جدایه مقاوم به متی‌سیلین شناسایی شد و در مطالعه مشابه دیگری در تهران،

نتیجه‌گیری

انتخاب مناسب‌ترین گزینه‌های درمانی برای این باکتری صورت گیرد و ارتباط احتمالی منشا بالینی این باکتری با پتانسیل حدت و مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی آن بررسی گردد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول است. نویسندگان مقاله از حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت تشکر و قدردانی می‌کنند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

نتایج این مطالعه بیانگر مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا و قابلیت تولید بیوفیلم در جدایه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در گیلان و در نتیجه پتانسیل بالای این جدایه‌ها در کلونیزه شدن، بیماری‌زایی و کسب مقاومت‌های دارویی چندگانه می‌باشد. این امر لزوم شناسایی سریع و کنترل عفونت ناشی از استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در بیمارستان‌ها، به منظور جلوگیری از کلونیزه شدن سویه‌های مقاوم و متعاقب آن افزایش هزینه‌های درمان را مشخص می‌سازد. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند در انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری در منطقه و جلوگیری از گسترش بیشتر جدایه‌های مولد بیوفیلم با مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی چندگانه مفید باشد. همچنین با توجه به وجود تنوع ژنتیکی در باکتری‌ها، گسترش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و تغییر الگوی مقاومت‌ها، پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری با تعداد نمونه‌های بیشتر برای شناسایی پتانسیل حدت جدایه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و

References

1. Dadgar T, Vahedi Z, Yazdansetad S, Kiaei E, Asaadi H. Phenotypic Investigation of Biofilm Formation and the Prevalence of icaA and icaD Genes in *Staphylococcus epidermidis* Isolates. Iran J Med Microbiol. 2019 Feb 10;12(6):371-81.
2. Mohammadzadeh N, Teymouri F, Razavi S, Hasannejad-Bibalan M, Bialvaei AZ, Amirmozafari N, Mirzaei R. The phenotypic and genotypic characteristics of biofilm formation and SCCmec typing of *Staphylococcus epidermidis* isolated from different sources. Gene Rep. 2019 Dec 1;17:100444.
3. Rahimi F, Arabestani MR. Biofilm production among *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from healthy people. BJM. 2016 Aug 22;5(18):107-16.
4. Du X, Zhu Y, Song Y, Li T, Luo T, Sun G, Yang C, Cao C, Lu Y, Li M. Molecular analysis of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from community and hospital environments in China. PloS one. 2013 May 13;8(5):e62742.
5. Mack D, Becker P, Chatterjee I, Dobinsky S, Knobloch JK, Peters G, Rohde H, Herrmann M. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. Int J Med Microbiol. 2004 Sep 24;294(2-3):203-12.

6. Pinheiro L, Brito CI, de Oliveira A, Pereira VC, de Souza MD. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: detection of biofilm genes and biofilm formation in blood culture isolates from patients in a Brazilian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016 Sep 1;86(1):11-4.
7. Mack D, Davies AP, Harris LG, Rohde H, Horstkotte MA, Knobloch JK. Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Anal Bioanal Chem*. 2007;387: 399–408.
8. Najar-Peerayeh S, Jazayeri Moghadas A, Bakhshi B. *Staphylococcus epidermidis* virulence factor and ability of macroscopic biofilm production. *Koomesh*. 2016 Apr 11:918-23.
9. Ziebuhr W, Hennig S, Eckart M, Kranzler H, Batzilla C, Kozitskaya S. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;28:S14–20.
10. Kazami F, Tajbakhsh E. Determination of antibiotic resistance pattern and detection of tetK, ant (4)-Ia, vanA, and ermA genes in *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in Shahrekord, (IRAN). *Qom University of Medical Sciences Journal*. 2017 Nov 10;11(8):57-65. [Full Text in Persian]
11. Tahmasebi H, Dehbashi S, Arabestani M R. Determination of Antimicrobial Resistance Pattern in Methicillin-Resistant *Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus epidermidis* and Detection of Resistance Genes to Clindamycin and Erythromycin. *Iran J Med Microbiol*. 2018; 12 (3) :169-178. [Full Text in Persian]
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. Document M100-S24. Wayne PU.2020.
13. Abbondio M, Fois I, Longheu C, Azara E, Tola S. Biofilm production, quorum sensing system and analysis of virulence factors of *Staphylococcus epidermidis* collected from sheep milk samples. *Small Ruminant Res*. 2019 May 1;174:83-7.
14. Fluit AC, Schmitz FJ, Verhoef J. Frequency of isolation of pathogens from blood stream, nosocomial pneumonia, skin & soft tissue, and urinary tract infections occurring in European patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001; 20(3): 188-191.
15. Lalle S, Thouverez MK. Bacteraemia caused by coagulase negative staphylococci exhibiting decreased susceptibility to teicoplanin. *J Hosp Infect*. 2002; 1(3): 207-14.
16. Oscoei Abdoli S, Ahangarzadeh Rezaei M, Ajang A, Abdinia B. Determination of antibiotic resistance pattern and minimum inhibitory concentration of vancomycin in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative isolated from pediatric clinical samples in Tabriz. *J Ardabil Univ Med Sci*. 2013;13(1):25-34. [Persian]
17. Shrestha LB, Bhattarai NR, Khanal B. Comparative evaluation of methods for the detection of biofilm formation in coagulase-negative Staphylococci and correlation with antibiogram. *Infect Drug Resist*. 2018; 11:607-13.

18. Nami Y, Ghiami Rad M, Farah Bakhsh H, Imeni N. Study of Antibiotic Resistance Pattern in Coagulase-negative Staphylococci strains Isolated from Clinical Specimens. Avicenna J Clin Med. 2018; 25(2): 85-91.[Persian].
19. Shariati L, Shojapour M, Validi M, Farrokhi E, Tabatabaiefar MA, Karimi A, et al. The investigation of prevalence of methicillin and vancomycin resistance in coagulase negative Staphylococci isolated from clinical samples of Shahrekord university hospitals, 2009. Iran South Med J. 2011; 14(3):165-72. [Persian]
20. Nourbakhsh F, Momtaz H. An investigation of antibiotic resistance pattern in the strains of methicillin-resistant *staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in Isfahan province, Iran. Qom Univ Med Sci J. 2016;10(6):68-74. [Full Text in Persian]
21. Hasanvand H, Teymouri F, Ohadi E, Azadegan A, Sadeghi Kalani B. Biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolated from hospitalized patients. Arch Clin Infect Dis. 2019 Jun 30;14(3).
22. Zalipour M, Sedigh Ebrahim-Saraie H, Sarvari J, Khashei R. Detection of biofilm production capability and icaA/D genes among staphylococci isolates from Shiraz, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2016 Dec 1;9(12) : e41431.
23. Sahal G, Bilkay IS. Multi drug resistance in strong biofilm forming clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. Braz J Microbiol. 2014;45(2):539–44.