

Expression of *aap* and *icaR* genes involved in biofilm production in clinical strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and gentamicin

Heydari N., MSc¹, Tahmasebi H., MSc², Zeini B., MSc¹, Dehbashi S., PhD Student³, Arabestani M.R., PhD^{4,5}

1. MSc, Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

2. MSc, Department of Microbiology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

3. PhD student, Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

4. Associate professor, Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

5. Associate professor, Nutrition Health Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran (Corresponding Author), Tel: +98-81-238380755, mohammad.arabestani@gmail.com

ABSTRACT

Backgrounds and Aim: *Staphylococcus aureus* biofilms are involved in a multitude of serious chronic infections. Production of biofilms is a defensive-invasive process controlled and regulated by the *aap* and *icaR* genes. The expression levels of these genes play an important role in the formation of biofilm. The aim of this study was to investigate the expression of *icaR* and *aap* regulatory genes in clinical isolates of *S. aureus* resistant to methicillin and gentamicin.

Materials and Methods: In this analytical study, among 285 samples, we detected 100 isolates of methicillin resistant and 82 isolates of gentamicin resistant *S. aureus*. Resistant strains were evaluated for the presence of biofilm regulatory genes. The expression levels of regulatory genes were measured by real-time PCR method. We used SPSS software 16 for statistical analysis and also REST 2008 V3 software for analysis of quantitative results.

Results: Among 100 methicillin resistant and 82 gentamicin resistant isolates of *S. aureus* the highest expression levels of *icaR* and *aap* genes were detected in the smears obtained from the wounds and catheters. Moreover, a different pattern of gene expression was observed in multidrug resistant strains in comparison to the strains with lower rate of resistance. Also, there was a significant relationship between the presence and activity of regulatory genes and biofilm formation in different samples ($p \leq 0.05$).

Conclusion: Considering the frequency of biofilm producing strains of *S. aureus* in the smears from the catheters and wounds and also increased gene expression, appropriate therapeutic measures should be considered for methicillin and gentamicin resistant of *S. aureus*.

Keywords: Drug resistance, *S. aureus*, Virulence factors, Methicillin, Gentamicin, Gene expression.

Received: Aug 2, 2017 **Accepted:** Nov 6, 2017

بررسی میزان بیان ژن های *aap* و *icaR* دخیل در بیوفیلیم در سویه های بالینی

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و جنتامایسین

نرگس حیدری^۱، حامد ظهاسبی^۲، بهروز زینی^۱، ساناز ده باشی^۳ محمد رضا عربستانی^۴

۱. کارشناس ارشد، گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

۲. کارشناس ارشد، گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

۳. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

۴. دانشیار، گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

۵. دانشیار، مرکز تحقیقات سلامت تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران (مولف مسوول)، تلفن ثابت: ۰۸۱-۲۳۸۳۸۰۷۵۵

mohammad.arabestani@gmail.com

چکیده:

زمینه و هدف: بیوفیلیم *استافیلوکوکوس اورئوس* مسئول بروز عفونت های مختلفی می باشد. تولید بیوفیلیم یک فرآیند دفاعی - تهاجمی است که توسط ژنهای *aap* و *icaR* کنترل و تنظیم می شود. میزان بیان این ژنها نقش بسیار مهمی در قدرت تشکیل بیوفیلیم دارند، از این رو هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان ژنهای تنظیمی *icaR* و *aap* در جدایه های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین و جنتامایسین قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تحلیلی، ۱۰۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین و جنتامایسین از مجموع ۲۸۵ نمونه جمع آوری شد. سویه های مقاوم جهت حضور اپرون های تنظیمی بیوفیلیم مورد ارزیابی کمی-مولکولی قرار گرفتند. جهت سنجش میزان بیان ژنهای تنظیمی از روش Real-Time PCR استفاده گردید. به منظور آنالیزهای آماری (توصیفی-تحلیلی) از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد و جهت آنالیز نتایج کمی بدست آمده از نرم افزار REST 2008 V3 استفاده شد.

یافته ها: از مجموع ۱۰۰ جدایه بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین و ۸۲ جدایه مقاوم به جنتامایسین بدست آمده، بیشترین میزان بیان ژن های تنظیمی *aap* و *icaR* در نمونه های زخم و کاتاتر مشاهده شد. علاوه بر این، میزان بیان ژن در سویه های دارای مقاومت چندگانه نسبت به سویه های دارای مقاومت کمتر، دارای الگوی متفاوتی بود. همچنین، بین حضور و فعالیت ژنهای تنظیمی و تولید بیوفیلیم در نمونه های مختلف ارتباط معنی داری مشاهده شد ($p < 0.05$).

نتیجه گیری: با توجه به فراوانی سویه های تولید کننده بیوفیلیم در جدایه های بدست آمده از کاتاتر و زخم، و افزایش بیان ژنی در این نمونه ها، باید الگوی دارویی مناسبی را در سویه های مقاوم به متی سیلین و جنتامایسین اتخاذ نمود.

واژه های کلیدی: مقاومت دارویی، *استافیلوکوکوس اورئوس*، عوامل بیماری زا، متی سیلین، جنتامایسین، بیان ژن

وصول مقاله: ۹۶/۵/۱۱ اصلاحیه نهایی: ۹۶/۸/۳ پذیرش: ۹۶/۸/۱۵

مقدمه

بیوفیلیم شامل مجموعه ای از میکروارگانیزم ها می باشد که در سطح و ماتریکس یک جسم غیر زنده و یا یک موجود زنده بهم متصل شده و سبب ایجاد یک سطح ژله ای می شوند. بیوفیلیم اولین بار توسط Heukelekian و همکاران بصورت یک لایه ناشناس مورد مشاهده قرار گرفت و سرانجام Costerton و همکاران در سال ۱۹۷۸ تئوری حضور بیوفیلیم در باکتری ها را ارائه دادند (۱). این لایه علاوه بر اینکه محیطی مناسبی برای باکتری فراهم می کند، شرایط ایده آلی را برای رشد و تکثیر با آن در محیط های ناپایدار بوجود می آورد (۲). از مهمترین ویژگی های بیوفیلیم می توان به کمک به بقاء باکتری در شرایط سخت محیطی، نقش در بیماری زایی و ایجاد بیماری های مزمن، اثر گذاری آن در ایجاد و تقویت مقاومت دارویی از طریق نفوذ ناپذیری آنتی بیوتیک در ماتریکس پلیمری، تسهیل در انتقال ژن از طریق کانژوگاسیون و افزایش جهش های ژنتیکی بواسطه این اتصالات باکتریایی، بوجود آمدن سویه های ژنوتیپی جدید در اثر موتاسیون یا جهش در داخل بیوفیلیم و فعال شدن ژن های مسئول ویرولانسی باکتری در شکل بیوفیلیم، اشاره کرد (۳ و ۲).

نقش بیماری زا بودن این لایه پلی ساکاریدی در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بسیار مهم می باشد، بطوریکه در سال ۲۰۰۷ کمیته کنترل کننده سلامت و یا وابسته به سازمان بهداشت جهانی یا Healthcare (HICPAC) Infection Control Practices Advisory Committee طی یک دستورالعمل خاص، روش های مقابله با این عوامل بیماری زا، از جمله بیوفیلیم را ارائه داد (۴). حضور این لایه توسط گروه خاصی از اوپرون های ساختاری به نام اوپرون های داخل سلولی یا Intracellular Adhesin (ICA) کد می شود که دارای لوکوس های ژنی مختلف شامل *icaD*، *icaR* و *icaB* می باشد (۴ و ۵). این لوکوس ژنی ارتباط

تنگاتنگی با ادهزین های پلی ساکاریدی داخل سلولی و یا Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA) دارد (۶). *icaR* محصول یک پروتئین عبوری از سطح لایه های غشایی می باشد که با N-acetyl-glucosaminyltransferases دارای همولوژی می باشد. این ژن که یک القا گر اولیه برای شروع ساخت بیوفیلیم در استافیلوکوکوس اورئوس می باشد، با دریافت سیگنال های محیطی بواسطه PIA ها باعث بیان آشاری سایر ژن های لوکوس *ica* می شود (۷). این ژن با حضور UDP-Nacetylglucosamine فعالیت خود را آغاز می کند و تنها ژن *ica* می باشد که خاصیت ترانسفرازی دارد. *icaD* یک انتقال دهنده پیام (چاپرون) به سایر ژن های این لوکوس می باشد که با کمک *icaR* سبب فعال شدن آنزیم های خاصی جهت ایجاد ارتباط و بیان شدن *icaC* با *icaR* و *icaD* می شود، بطوریکه وقتی همکاری *icaR* و *icaD* شروع می شود، میزان بیان بیوفیلیم ۲۰ برابر افزایش می باشد (۸). این امر گاهی سبب می شود که حتی با حضور *icaRD* در برخی سویه ها تولید بیوفیلیم را شاهد باشیم. *icaC* که ارتباط بین فضای داخلی و خارجی غشای سیتوپلاسمی باکتری را بر عهده دارد، یکی از طولانی ترین توالی های بین غشایی را داراست. این بخش سبب ارتباط *icaD* با قسمت خارجی غشاسیتوپلاسمی می شود و ارتباط آن *icaB* می شود (۸). *icaB* تنها لوکوسی می باشد بصورت خارج سیتوپلاسمی قرار گرفته است و ارتباط سطحی باکتری با PAI ها را حفظ می کند.

Accumulation-Associated Protein (AAP) یکی از مهم ترین پروتئین های تنظیمی در تجمع و شکل گیری بیوفیلیم می باشد. فعال شدن این پروتئین تحت شرایط محیطی و برخی عوامل نامساعد شکل می گیرد که در نهایت تشکیل بیوفیلیم را تشدید می کند، این پروتئین توسط *aap* کد می شود (۹).

در مقابله و درمان عفونت های ایجاد شده توسط این باکتری داشته باشد. علاوه بر مطالعه، با تجزیه و تحلیل مقادیر حاصل از بیان ژن های دخیل در تولید بیوفیلم در ایزوله های جدا شده از نمونه های بالینی مختلف، می توان بر اساس نوع نمونه بالینی، دستورالعمل درمانی خاصی را جهت کنترل *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید کننده بیوفیلم اتخاذ کرد، لذا هدف از این مطالعه، تعیین ارتباط بیان ژن های تنظیمی *aap* و *icaR* در سویه های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین و جنتامایسین و سویه های حساس بود.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، که با استفاده از روش نمونه گیری آسان و دردسترس صورت گرفت، طی یک دوره ۹ ماهه ۲۸۵ نمونه بالینی از بیماران بستری در بخشهای مختلف مراکز درمانی دانشگاه علوم پزشکی شهر همدان در سال ۱۳۹۵ جمع آوری شد. فواصل زمانی نمونه گیری در فصول مختلف سال تعیین گردید و از خرداد تا دی نمونه های مختلف بالینی جهت جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس* جمع آوری گردید. معیار ورود و خروج نیز بر اساس باکتریایی بودن عفونت های گزارش شده و همچنین طولانی بودن مدت بستری بیماران در بیمارستان تعیین شد. در نهایت جدایه های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین جدا سازی شد. جهت جداسازی باکتری های مورد نظر از تست های بیوشیمیایی مختلف نظیر کواگولاز، کاتالاز، تخمیر مانیتول و همچنین تست DNA از استفاده گردید. به منظور جداسازی گونه های *استافیلوکوکوس* و میکروکوکوس نیز تست اکسیداز مورد استفاده قرار گرفت (۱۶ و ۱۷).

سویه های مقاوم به جنتامایسین و متی سیلین با استفاده از دیسکهای جنتامایسین ۱۰ میکروگرمی و سفوکسیتین ۳۰ میکروگرمی (Mast، انگلستان) با روش انتشار از دیسک

برای اولین بار در سال ۱۹۷۵، گونه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به جنتامایسین و متی سیلین گزارش شد. این در حالی است که، مقاومت به آنتی بیوتیک های جدید نیز در این جنس در حال گسترش می باشد (۱۰). علاوه بر این، برخی عوامل مقاومتی می توانند بین گونه های یک جنس و یا حتی جنس های مختلف باکتریایی گردش داشته باشند و سبب انتقال مقاومت های چندگانه آنتی بیوتیکی بین باکتری های مختلف شود (۱۱). این انتقال ژنی گاهی بین باکتری های آلوده کننده مواد غذایی و باکتری های جدا شده از بالین نیز مشکل ساز می شود. خصوصاً در مورد باکتری هایی که توانایی تولید بیوفیلم را دارا می باشند (۱۲).

در زمینه ی تعیین بیان ژن های دخیل در تولید بیوفیلم در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و ارتباط آن با مقاومت های آنتی بیوتیکی مطالعات مختلفی صورت گرفته است. همکاران Bintaو Cui و همکاران و Claire Marquès و همکاران هر دو در سال ۲۰۱۵ با مطالعه بر گونه های *استافیلوکوکوس*، میزان بیان ژن های دخیل در تولید بیوفیلم در سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک ها مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش ها نشان داده شد که برخی آنتی بیوتیک ها بطور غیر مستقیم با مهار *icaA* و *icaD* از تولید بیوفیلم در این باکتری ها جلوگیری کردند (۱۴ و ۱۳). همچنین Atshan و همکاران در سال ۲۰۱۲ با مطالعه بر روی سویه های حساس و مقاوم *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان دادند که بیان برخی ژن های دخیل در بیوفیلم در سویه های مقاوم از میزان بیشتری برخوردار می باشند (۱۵). با توجه به اهمیت نقش برخی مهار کننده ها در بیان ژن های دخیل در تولید بیوفیلم و همچنین نقش و جایگاه مهم سویه های تولید کننده بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* در عفونت های بالینی و حتی آلودگی های غذایی، شناسایی این سویه ها و تعیین میزان بیان ژن های لوکوس ژنی *ica* و تنظیم کننده های اصلی تولید بیوفیلم، می تواند نقش موثری

محصولات سنتز شده جهت آزمایش نهایی در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۲۰). میزان بیان ژنهای مورد مطالعه با استفاده از روش کمیت سنجی نسبی تعیین شدند. برای این منظور و با استفاده از روش Real Time PCR و رنگ سایرگرین (Amplicon، دانمارک) ارزیابی گردید. مخلوط تهیه شده جهت انجام واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر تهیه گردید. بدین صورت بود که از مستر میکس (Amplicon، دانمارک) به میزان ۱۰ میکرولیتر، از هر پرایمر (Macrogen، کره) رفت و برگشت ۱ میکرولیتر و ۱ میکرولیتر از cDNA سنتز شده استفاده گردید. حجم باقی مانده با استفاده از محلول DEPC (شرکت-Sigma Aldrich، آمریکا) فاقد RNA به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. چرخه های دمایی جهت تکثیر ژن های مورد نظر بصورت ۱۰ دقیقه مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد و ۴۰ سیکل برای مراحل واسرشت سازی ثانویه بمدت ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد و اتصال پرایمر به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد لحاظ گردید. مرحله طویل سازی نیز در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۱۵ ثانیه تعیین شد (جدول ۱). تمامی مراحل فوق با استفاده از دستگاه Real Time PCR Step One Plus (ABI، آمریکا) تنظیم گردید (۲۱).

تعیین گردید. برای کنترل کیفی و ارزیابی نتایج، از استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923 کنترل منفی و استافیلوکوکوس اورئوس ATCC43300 بعنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۷ و ۱۸).

جهت شناسایی سویه های تولید کننده بیوفیلم به روش فوتویی از روش میکرو پلیت ۹۶ خانه ای استفاده شد. به این صورت که بعد از تلقیح باکتری در محیط تریپتو سوی براث (Merck، آلمان) و گرمخانه گذاری ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه، نمونه ها داخل پلیت های ۹۶ خانه ای ریخته شد و با استفاده از رنگ کریستال ویوله رنگ آمیزی شدند. در نهایت با قرائت جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر نتایج مورد بررسی قرار گرفت (۱۹).

استخراج RNA Total با استفاده از کیت REboEx (شرکت پیشگام، ایران) صورت گرفت و جهت سنتز cDNA نیز از (کیت سنتز شرکت Eurx، آمریکا) استفاده گردید. مراحل نهایی کار از جمله خلوص سنجی RNA Total و cDNA های سنتز شده از نظر کیفی بر اساس نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات بدست آمده بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد و همچنین از نظر کمی بر اساس تعیین جذب نوری مطابق با مطالعات Ares M صورت گرفت و

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Real Time PCR

منبع	طول محصولات	توالی نوکلئوتیدی	ژن های مورد مطالعه
۲۱	۳۱۸	ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATTAACACTACAACGTAATCGTA	<i>gmk</i>
۲۱	۴۶۹	TAA TCC CGA ATT TTT GTG AA AAC GCA ATA ACC TTA TTT TCC	<i>icaR</i>
۲۲	۱۳۳	AGAACCTACAACCTCAGAACCTGTG AA ACCTTTAACCGTAGTTGGCGGTAT	<i>aap</i>

جدایه (۱۸ درصد) دارای قطر هاله بیشتر از ۱۴ میلی‌متر بودند که بعنوان حساس در نظر گرفته شدند (جدول ۲). هیچ سویه مقاوم به ونکومايسين دیده نشد. از ۸۲ سویه مقاوم به جنتامایسین و متی سیلین بعد از انجام غربالگری اولیه جهت تعیین سویه های تولید کننده بیوفیلیم توسط روش کریستال ویوله، ۱۵ جدایه دارای تظاهرات فتوتیبی تولید بیوفیلیم بودند. همچنین از سویه های حساس به متی سیلین و جنتامایسین، ۴ جدایه دارای دقت بالای تشکیل بیوفیلیم بودند (شکل ۱).

این مطالعه با محوریت مطالعه بر روی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس دارای مقاومت همزمان به جنتامایسین و متی سیلین، صورت پذیرفت. میزان بیان ژن های *aap* و *icaR* در سویه های مقاوم و حساس به متی سیلین و جنتامایسین بدین صورت بود که، در ۵ ایزوله بالینی دارای مقاومت های هم زمان به متی سیلین و جنتامایسین، با توجه به سویه کنترل (سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923)، همه ایزوله ها با افزایش بیان ژن های مورد بررسی همراه بودند (جدول ۳) (نمودار ۱). همچنین در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین و جنتامایسین نیز با توجه به سویه کنترل (سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923)، افزایش بیان ژن های *aap* و *icaR* در سویه های A1.S، A2.S، A4.S و A5.S مشاهده شد و سویه A1.S دارای کاهش بیان ژن های ذکر شده بود (جدول ۴) (نمودار ۲). این در حالی بود که، مقادیر بیان بدست آمده از میزان بیان ژن های مورد بررسی در سویه های مقاوم به متی سیلین و جنتامایسین بیشتر از سویه های حساس بودند.

ارتباط حضور و میزان بیان ژن *aap* و نوع نمونه بالینی: بر اساس بررسی های کیفی صورت گرفته مبتنی بر آمار توصیفی، ارتباط معنی داری بین حضور و فعالیت این ژن و نوع نمونه بالینی مشاهده شد. بطوریکه مقادیر P.value بدست آمده از فعالیت ژن *aap* بر اساس نوع نمونه و با

با استفاده از فرمول $Efficiency = 10^{(-1/slope)} - 1$ بازدهی واکنش PCR time-Real ارزیابی گردید. بدین صورت که برای این کار رقت های مختلف از محصول PCR حاصل را تهیه کرده و سپس برای آنها تست PCR time-Real انجام و از CT های حاصل و غلظت موجود جهت ترسیم نمودار استاندارد استفاده شد. محاسبه بیان ژن ها بر اساس فرمول $1 + Efficiency$ ($-\Delta CT$) و مطالعات Pfaffl method انجام پذیرفت که در این بررسی یک ژن رفرانس و یک یا چند ژن هدف وجود دارد. در این بررسی از ژن *gmk* عامل Guanylate kinase، بعنوان ژن رفرانس برای تعیین میزان بیان ژن های مورد مطالعه استفاده شد (۲۳). تمامی تعیین مقاومت ها بر اساس قطر هاله، با استفاده از Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) نسخه ۲۰۱۶ صورت گرفت (۱۷).

برای تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از Relative Quantitation و $\Delta\Delta t_c$ از نرم افزار RG-REST نسخه ۲۰۰۸ استفاده گردید. از آزمون آماری کای-دو برای مقایسه یافته های کیفی و تست مثبت مستقل برای مقایسه یافته های کمی مورد استفاده قرار گرفتند (در این مطالعه مقدار $p \leq 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد).

یافته ها

از میان تمام جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه، ۱۰۰ جدایه (۳۵/۷۱ درصد) دارای قطر هاله ۲۱ یا کمتر از ۲۱ میلی‌متر بودند که بعنوان مقاوم به متی سیلین و ۱۸۰ جدایه (۶۴/۲۸ درصد) دارای قطر هاله بیشتر از ۲۱ میلی‌متر بودند که بعنوان حساس به متی سیلین در نظر گرفته شدند. همچنین از میان تمام جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مورد مطالعه، ۸۲ جدایه (۸۲ درصد) دارای قطر هاله ۱۲ یا کمتر از ۱۲ میلی‌متر بودند که بعنوان مقاوم و ۱۸

بدست آمده از فعالیت ژن *icaR* بر اساس نوع نمونه و با استفاده از آزمون کای-دو برای نمونه های خون، ادرار، کاتاتر، زخم و سواپ بینی به ترتیب کمتر از ۰/۰۴۴، ۰/۰۳۱، ۰/۰۴۹ و ۰/۰۳۵ بود. این در حالی بود که میانگین P.value محاسبه شده برای نوع نمونه بالینی و میزان بیان ژن aap مقدار ۰/۰۳۹ بدست آمد.

ارتباط حضور و میزان بیان ژن *icaR* و نوع نمونه بالینی: بر اساس بررسی های کیفی صورت گرفته مبتنی بر آمار توصیفی، ارتباط معنی داری بین حضور و فعالیت این ژن و نوع نمونه بالینی مشاهده شد. بطوریکه مقادیر P.value

ژن *icaR* مقدار ۰/۰۲۲ بدست آمد.

استفاده از آزمون کای-دو برای نمونه های خون، ادرار، کاتاتر، زخم و سواپ بینی به ترتیب کمتر از ۰/۰۴۴، ۰/۰۳۱، ۰/۰۴۹ و ۰/۰۳۵ بود. این در حالی بود که میانگین P.value محاسبه شده برای نوع نمونه بالینی و میزان بیان ژن aap مقدار ۰/۰۳۹ بدست آمد.

ارتباط حضور و میزان بیان ژن *icaR* و نوع نمونه بالینی: بر اساس بررسی های کیفی صورت گرفته مبتنی بر آمار توصیفی، ارتباط معنی داری بین حضور و فعالیت این ژن و نوع نمونه بالینی مشاهده شد. بطوریکه مقادیر P.value

جدول ۲. فراوانی آنتی بیوتیک های مورد مطالعه در سویه های بالینی / استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

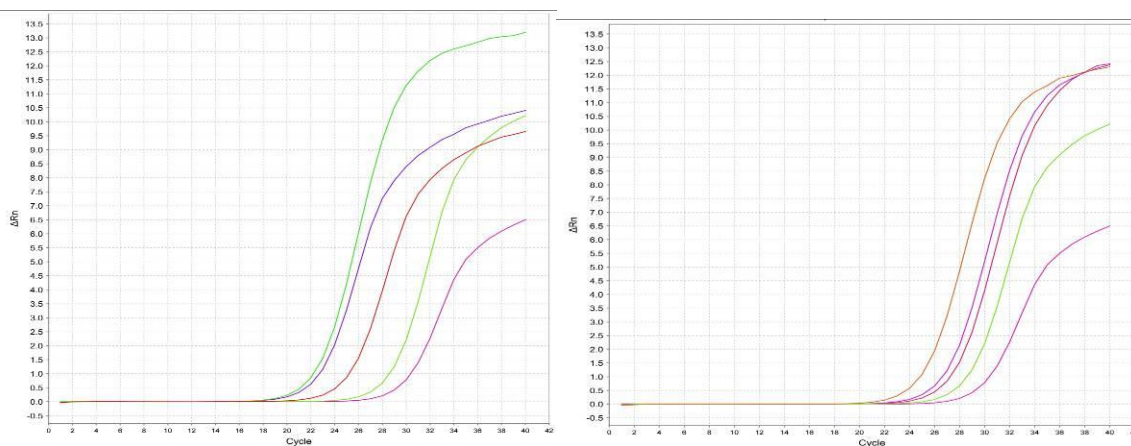
آنتی بیوتیک	حساس تعداد(درصد)	نیمه حساس تعداد(درصد)	مقاوم تعداد(درصد)
سفوکسیتین	۰	_____	۱۰۰ ۱۰۰ درصد
ونکومايسين	۱۰۰	_____	۰ ۰ درصد
جتتامایسین	۱۳	۵	۸۲ ۸۲ درصد
	۱۳ درصد	۵ درصد	۸۲ درصد

جدول ۳- مقادیر چرخه دمایی (CT) بدست آمده از ژن های *aap* و *icaR* و *gmk* در جدایه های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم. میزان بیان با توجه به فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ در جدول لحاظ شده است.

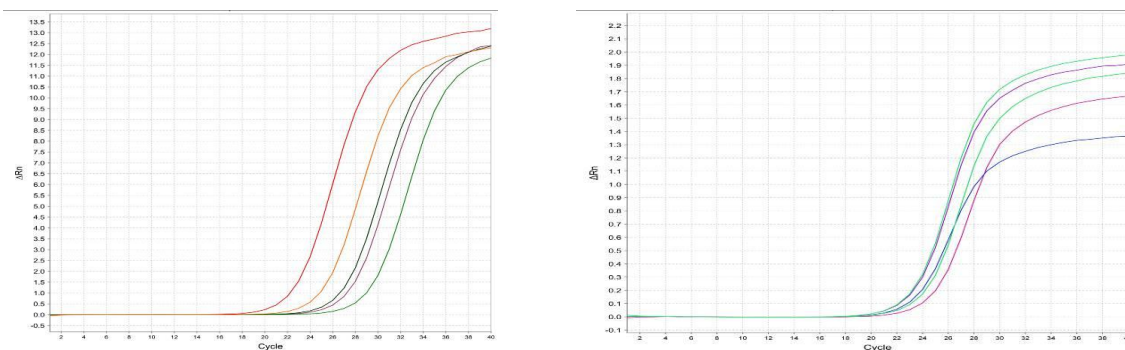
ژن رفرانس	ژن <i>aap</i>	ژن <i>icaR</i>	حساسیت واکنش
۱/۰۹۰۰	۱/۱۴۴۰	۱/۳۰۱۰	
$2^{-\Delta\Delta CT}$			
نتیجه بیان ژن <i>aap</i>	نتیجه بیان ژن <i>icaR</i>	چرخه دمایی ژن <i>gmk</i>	چرخه دمایی ژن <i>icaR</i>
مقادیر چرخه دمایی	چرخه دمایی ژن <i>aap</i>	چرخه دمایی ژن <i>icaR</i>	مقادیر چرخه دمایی
۱	۱	۲۵/۰۴	کنترل
۱۰/۳۳۷۲۷۳۸۱	۱۱/۲۲۲۱۲۹۲۹	۳۰/۹۶	ایزوله با کد A1
۵/۲۳۹۷۹۱۴۸۴	۳/۵۰۸۲۰۹۰۱۲	۲۹/۰۷	ایزوله با کد A2
۱/۴۳۱۵۸۱۷۲۷۷	۵/۶۴۸۴۷۷۳۵۵	۳۰/۷۸	ایزوله با کد A3
۱/۰۹۳۲۲۲۶۴۹	۷/۴۷۱۵۳۹۹۲۳	۲۱/۱۱	ایزوله با کد A4
۷/۵۳۰۳۲۱۰۳۶	۵/۵۰۷۶۴۴۳۷۳	۳۴/۰۹	ایزوله با کد A5

جدول ۴- مقادیر چرخه دمایی (CT) بدست آمده از ژن های *aap* و *icaR* و *gmk* در جدایه های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس. میزان بیان با توجه به فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ در جدول لحاظ شده است.

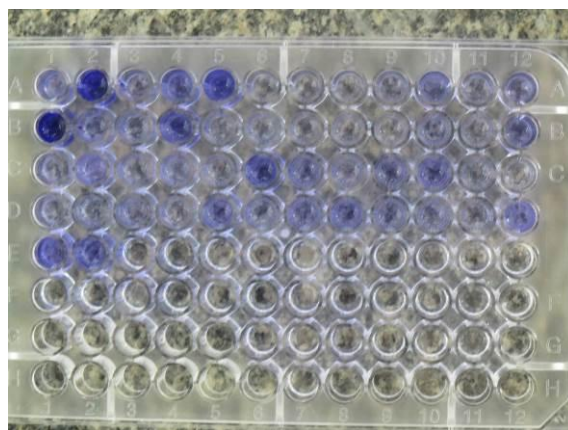
ژن رفرانس	ژن <i>aap</i>	ژن <i>icaR</i>	حساسیت واکنش
۱/۰۹۰۰	۱/۱۴۴۰	۱/۳۰۱۰	
$2^{-\Delta\Delta CT}$			
نتیجه بیان ژن <i>aap</i>	نتیجه بیان ژن <i>icaR</i>	چرخه دمایی ژن <i>gmk</i>	چرخه دمایی ژن <i>icaR</i>
مقادیر چرخه دمایی	چرخه دمایی ژن <i>aap</i>	چرخه دمایی ژن <i>icaR</i>	مقادیر چرخه دمایی
۱	۱	۲۵/۰۴	کنترل
۳/۷۴۳۶۰۰۸۳۱	۶/۱۷۵۴۱۰۱۱۳	۳۰/۹۶	ایزوله با کد A1.S
۴/۱۴۶۲۲۳۶۲۷	۳/۵۸۲۸۴۱۸۹۲	۲۹/۰۷	ایزوله با کد A2.S
۰/۹۶۲۶۳۳۶۵۵	۱/۵۸۰۶۲۶۵۶۵	۳۰/۷۸	ایزوله با کد A3.S
۱/۶۳۶۷۶۶۳۷۴	۲/۶۶۳۴۴۱۲۳۳	۲۱/۱۱	ایزوله با کد A4.S
۳/۴۰۰۲۸۸۷۷	۲/۴۶۱۹۳۹۴۲۳	۳۴/۰۹	ایزوله با کد A5.S



نمودار ۱. نمودار تکثیر ژن های *icaR* (سمت راست) و *aap* (سمت چپ) در ایزوله های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین و جنتامایسین بر اساس $\Delta\Delta CT$. میزان ترشولدر ۰/۰۰۰۱ در نظر گرفته شده است.



نمودار ۲. نمودار تکثیر ژن های *icaR* (سمت راست) و *aap* (سمت چپ) در ایزوله های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس به متی سیلین و جنتامایسین بر اساس $\Delta\Delta CT$. میزان ترشولدر ۰/۰۰۰۱ در نظر گرفته شده است.



شکل ۱- نتیجه حاصل از تست فنوتیپی تشخیصی سویه های حامل بیوفیلم. چاهک شماره ۱ در ردیف A کنترل منفی و چاهک ۲ در ردیف A کنترل مثبت

بحث

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به منظور حفظ بقای خود در شرایط ناپایدار محیطی، در گذر زمان، دچار تغییرات زیادی شده است. یکی از مهم ترین مواردی که می توان به آن اشاره کرد، توانایی این باکتری در تولید لایه های خارجی جهت اتصال قوی تر و مقاومت بیشتر در برابر عوامل از بین برنده می باشد. بیوفیلیم یکی از این عوامل خارجی می باشد که می تواند علاوه بر ایفای نقش خود در بیماری زایی، نقش موثری در بروز مقاومت های آنتی بیوتیکی نیز داشته است. مقاومت به متی سیلین و جنتامایسین در *استافیلوکوکوس اورئوس*، یکی از مهم ترین موارد مقاومت آنتی بیوتیکی است که درمان عفونت های وابسته به این باکتری را با مشکلاتی مواجه کرده است (۲۳). دخالت ژن های مختلف در تولید بیوفیلیم و نقش آنها در کنترل تولید این عامل بیماری زا در *استافیلوکوکوس اورئوس*، می تواند این باکتری را در برابر نفوذ برخی آنتی بیوتیک های موثر بر دیواره سلولی و یا قسمت های داخلی، مقاوم کند. در این بین نقش لوکوس *ica* به خوبی مشخص شده است (۲۴). Cramiton و همکاران در مطالعه خود گزارش کردند که عدم تشکیل بیوفیلیم در *استافیلوکوکوس اورئوس* ممکن است در نتیجه حذف اپرون *ica* باشد. بر طبق یافته های *suzuki* و همکاران در سال ۲۰۱۲ در آمریکا حتی محل آناتومیکی و محیط فیزیولوژیکی که از آن نمونه ها جدا شده است ممکن است در تشکیل بیوفیلیم تاثیر گذار باشد به طوریکه فراوانی اپرون *ica* در جدایه های جدا شده از کیسه ملتحمه ۶۰ درصد در جدایه های جدا شده از پوست ۱۵ درصد گزارش شده است (۲۵ و ۲۶). این در حالی است که در مطالعه حاضر جدایه های بدست آمده از نمونه های خون و ادرار و کاتاتر دارای بیشترین فعالیت تولید بیان ژن های *aap* و *icaR* بودند. بطوریکه نمونه های A1 و A4 که از کاتاتر و خون جدا شدند دارای بالاترین میزان بیان ژنی با توجه به نمونه کنترلی بودند. اطلاعات بدست

آمده از این تحقیق با نتایج بدست آمده از مطالعات ذکر شده همخوانی نزدیکی داشت. یکی از مهم ترین فعالیت های بیوفیلیم در اتصال باکتری به سطوح و همچنین ابزارآلات پزشکی می باشد. این ابزارآلات که در مواردی همچون تزریق و یا خونگیری استفاده می شود، می تواند با منشر کردن باکتری، سبب ایجاد عفونت های منشر *استافیلوکوکوسی* شود. از این رو، سویه هایی که از نمونه های کاتاتر و یا زخم و ادرار جدا شده اند، این احتمال را می توان داد که از نظر فعالیت ژن های دخیل در تولید و تنظیم بیوفیلیم، بیشتر باشد (۲۵). این در حالی بود که، با استفاده از آزمون آماری کای-دو بین نوع نمونه های بالینی و میزان بیان ژن های *aap* و *icaR* ارتباط معنی داری مشاهده شد که مقادیر *P.value* برای هر یک به ترتیب ۰/۰۳۹ و ۰/۰۲۲ بدست آمد.

علاوه بر اینکه برخی عوامل مانند نوع نمونه بالینی در میزان بیان ژن های کنترلی مهم در تولید بیوفیلیم در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، نقش موثری دارند، برخی عوامل دیگر، مانند حضور آنتی بیوتیک ها و ظهور سویه های مقاوم نیز می تواند بیان این ژن ها را تحت اثر خود قرار دهد (۷). Saising و همکاران در سال ۲۰۱۵ در اسپانیا، با مطالعه بر روی اثر مهارتی برخی از آنتی بیوتیک ها بر تولید بیوفیلیم در *استافیلوکوکوس* ها، نشان دادند که *rhodomyrton* بعنوان یک آنتی بیوتیک طبیعی می تواند علاوه بر مهار ستنر بیوفیلیم، باکتری های مقاوم در این جنس را نیز از بین ببرد (۲۷). این امر تایید کننده نتایج بدست آمده در این پژوهش می باشد، بطوریکه با بیان سنجی سویه های حساس و مقاوم به آنتی بیوتیک ها متی سیلین و جنتامایسین، دیده شد که میزان بیان این ژن ها در سویه های حساس به میزان قابل توجهی با کاهش روبرو بود. در مطالعات مختلف نیز می توان دخالت حضور و اثر آنتی بیوتیک ها بر بیان ژن های دخیل در تولید بیوفیلیم را مشاهده

خود، در کنار کاهش آسیب پذیری خود، مقاومت آنتی بیوتیکی خود را نیز افزایش می دهند (۳۰).

نتیجه گیری

میزان بیان ژن های دخیل در تولید بیوفیلم می تواند در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای مقاومت و حساسیت به آنتی بیوتیک متفاوت باشد. این در حالی است که، برخی آنتی بیوتیک های پر کاربرد که سبب ظهور سویه های مقاوم می شوند، می توانند تحت تاثیر حضور برخی عوامل پوششی مانند بیوفیلم دچار کاهش قدرت اثر بخشی و یا حتی از دست دادن آن شوند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بیان ژن های *icaR* و *aap* می تواند در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم و حساس به متی سیلین و جنتامایسین کاملاً متفاوت باشد. از این رو، می توان این نتیجه را گرفت که عوامل بیماری زا مانند بیوفیلم، در کنار تحریک بیش از حد سیستم ایمنی و بروز فعالیت های ایمنولوژیکی حاد، می توانند در نحوه و نوع مقاومت های آنتی بیوتیکی نیز موثر باشند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح دانشجویی در سال ۱۳۹۵ با شماره ۹۵۷۱۳۴۲۰۳ و کد اخلاقی R.UMSHA.REC.1395.326 که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان به انجام رسیده است. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از این معاونت محترم ابراز می دارد.

References

1. Foster TJ, O'Reilly M, Patel AH, Bramley AJ. Genetic studies of *Staphylococcus aureus* virulence factors. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1988; 54:475-82.
2. 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: 223-39.

کرد، بطوریکه در بررسی هایی که توسط Bintaو Cui و همکاران بر گونه های *استافیلوکوکوس* در سال ۲۰۱۵ در استرالیا صورت گرفت مشخص شد، اثر بخشی آنتی بیوتیک اریترومایسین بر تولید بیوفیلم را مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش نشان داده شد که برخی آنتی بیوتیک ها بطور غیر مستقیم با مهار *icaR* و *icaD* از تولید بیوفیلم در این باکتری ها جلوگیری کردند (۲۸). Claire Marquès و همکاران در سال ۲۰۱۵ در فرانسه با مطالعه بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و اثر بخشی آنتی بیوتیک های مختلف بر مهار تولید بیوفیلم، عملکرد جنتامایسین، سفتارولین، سفازولین، اوفلوکساسین و گروهی دیگر از آنتی بیوتیک ها بر گروه ژنی *icaR* و *ica* گزارش داده شد (۲۹). نتایج این مطالعات که مشابه با نتایج مطالعه حاضر است، این امر را بیان می کند که بین سویه های حساس به آنتی بیوتیک و مقاوم به آنتی بیوتیک می تواند اختلافات زیادی از نظر کد شدن برخی ژن های پایه ای موثر بر تولید بیوفیلم داشته باشند. این در حالی است که، برخی ژن های کنترلی مانند *agr* که تولید عوامل بیماری زای *استافیلوکوکوس اورئوس* از جمله بیوفیلم را کنترل می کنند، هم در برخی سویه های مقاوم می تواند حالت افزایشی به خود بگیرد که در نهایت افزایش بیان ژن های پایین دستی از جمله *icaR* و *aap* را به دنبال خواهد داشت (۳۰). در نهایت با اطلاعات بدست آمده از این تحقیق که نشان دهنده حجم گسترده ای از مقاومت های چندگانه نیز می باشد، فعالیت این سویه ها که قدرت بیماری زایی خود را در شرایط نامساعد محیطی نیز حفظ می کنند، با حذف برخی اوپرون های واسط و بالا بردن تولید بیوفیلم

3. Rahimi F, Katouli M, Karimi S. Biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from catheterized patients with urinary tract infection. *Microb Pathog* 2016; 9: 69-76.
4. Thilakavathy P, Priyan RM, Jagatheeswari PA, Charles J, Dhanalakshmi V, Lallitha S, et al. Evaluation of Ica Gene in Comparison with Phenotypic Methods for Detection of Biofilm Production by Coagulase Negative Staphylococci in a Tertiary Care Hospital. *J Clin Diagn Res* 2015; 9: 16-9.
5. Tyner H, Patel R. Propionibacterium acnes biofilm - A sanctuary for *Staphylococcus aureus* Anaerobe 2016; 409: 63-7.
6. Namvar AE, Asghari B, Ezzatifar F, Azizi G, Lari AR. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *GMS Hyg Infect Control* 2013; 8: 3-15.
7. O'Gara JP. Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 270: 179-88.
8. Costa MO, Beltrame CO, Ferreira FA, Botelho AM, Lima NC, Souza RC, et al. Complete Genome Sequence of a Variant of the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST239 Lineage, Strain BMB9393, Displaying Superior Ability To Accumulate ica-Independent Biofilm. *Genome Announc* 2013; 1: 119-29.
9. Ulrich M, Bastian M, Cramton SE, Ziegler K, Pragman AA, Bragonzi A, et al. The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces ica gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. *Mol Microbiol* 2007; 65 :1276-87.
10. Heydari N, Alikhani M Y, Azizi Jalilian F, Tahmasebi H, Arabestani M R. Evaluation of real time PCR for detection of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistance strains based on melting curve analysis method. *Koomesh* 2017; 19 :877-86. [In Persian]
11. Arabestani M R, Tahmasebi H, Zeyni B. Diagnostic Value of Melting Curve Analysis Based on Multiplex-Real Time PCR in Identification of Enterococci Species . *Mazandaran Univ Med J* 2017; 26 :234-47.[In Persian]
12. Zeyni B, Arabestani M, YuosefiMashof R, Tahmasebi H. Evaluation of Real-time PCR-based DNA melting method for detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in clinical isolates. *BUMJ* 2017; 19 :26-33.[In Persian]
13. Kyoui D, Hirokawa E, Takahashi H, Kuda T, Kimura B. Effect of glucose on *Listeria monocytogenes* biofilm formation, and assessment of the biofilm's sanitation tolerance. *Biofouling* 2016; 32: 815-26.
14. Khangholi M, Jamalli A. The Effects of Sugars on the Biofilm Formation of *Escherichia coli* 185p on Stainless Steel and Polyethylene Terephthalate Surfaces in a Laboratory Model. *Jundishapur J Microbiol* 2016; 9: e40137.
15. Jahid IK, Lee NY, Kim A, Ha SD. Influence of glucose concentrations on biofilm formation, motility, exoprotease production, and quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *J Food Prot* 2013;76:239-47.
16. Bokaeian M, Tahmasebi H. Molecular Identification of Genes Responsible for Resistance to Aminoglycosides and Methicillin in Clinical Samples of *Staphylococcus Aureus*. *BUMJ* 2017; 19:38-46.[In Persian]
17. CLSI. M100-S25 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth informational supplement; 2015.

18. Arabestani MR, Rastiany S, Mousavi SF, Ghafel S, Alikhani MY. Identification of toxic shock syndrom and exfoliative toxin genes of *Staphylococcus aureus* in carrier persons, resistant and susceptible methicillin. *Tehran Univ Med J* 2015; 73: 554-60.[In Persian]
19. Jain A, Agarwal A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *J Med Microbiol* 2009;76:88-92.
20. Ares M. Bacterial RNA isolation. *Cold spring harbor protocols* 2012; 12:1024-7.
21. Chan WS, Chan TM, Lai TW, Chan JFW, Lai RWM, Lai CKC, et al. Complementary use of MALDI-TOF MS and real-time PCR–melt curve analysis for rapid identification of methicillin-resistant staphylococci and VRE. *J Antimicrob Chemother* 2015;70: 441-7.
22. Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, Visai L, Speziale P, Baldassarri L, et al. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *J Biomed Mater Res A* 2005;75:408-13.
23. Pfaffl WM. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:45.
24. Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Mahdouani K, Bakhrouf A. A microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. *New Microbiol* 2010; 33: 137-45.
25. Cramiton SE, Gerke C, Gotz F. In vitro methods to study staphylococcal biofilm formation. *Methods Enzymol* 2001; 336: 239-55.
26. Suzuki T, Kawamura Y, Uno T, Ohashi Y, Ezaki T. Prevalence of *Staphylococcus epidermidis* strains with biofilm-forming ability in isolates from conjunctiva and facial skin. *Am J Ophthalmol* 2005; 140: 844-50.
27. Saising J, Götz F, Dube L, Ziebandt AK, Voravuthikunchai SP. Inhibition of staphylococcal biofilm-related gene transcription by rhodomyrone, a new antibacterial agent. *Ann Microbiol* 2015; 65: 659-65.
28. Cui B, Smooker PM, Rouch DA, Deighton MA. Effects of erythromycin on the phenotypic and genotypic biofilm expression in two clinical *Staphylococcus capitis* subspecies and a functional analysis of *Ica* proteins in *S. capitis*. *J Med Microbiol* 2015; 64: 591-604.
29. Marques C, Tasse J, Pracros A, Collin V, Franceschi C, Laurent F, et al. Effects of antibiotics on biofilm and unattached cells of a clinical *Staphylococcus aureus* isolate from bone and joint infection. *J Med Microbiol* 2015; 64:1021-6.
30. Dai Y, Chang W, Zhao C, Peng J, Xu L, Lu H, et al. *VraR* Binding to the Promoter Region of *agr* Inhibits Its Function in Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and Heterogeneous VISA. *Antimicrob. Agents Chemother* 2017; 61: e02740-16.