

بررسی میزان شیوع توالی درج شونده IS256 و تشکیل بیوفیلیم در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از پوست افراد سالم

معصومه گودرزی^۱، محمدرضا مهرابی^{۲*}، محسن میرزایی^۲

(۱) گروه میکروبیولوژی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران
(۲) گروه علوم آزمایشگاهی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲

چکیده

مقدمه: مهم ترین عامل بیماری زایی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به واسطه تشکیل بیوفیلیم توسط یک ادهسین بین سلولی پلی ساکاریدی می باشد که تولید آن توسط اپرون icaADBC تنظیم می گردد. IS256 باعث تغییر فاز تشکیل بیوفیلیم توسط غیر فعال کردن اپرون ica می شود. هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع IS256 و تشکیل بیوفیلیم در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از پوست افراد سالم می باشد.

مواد و روش ها: ۹۱ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از سطح پوست افراد سالم جمع آوری گردید. تمام جدایه ها از نظر تشکیل بیوفیلیم به روش میکروتیتراپلیمت مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی حضور IS256 از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید. به علاوه تمام جدایه های دارای IS256 از نظر مقاومت آمینوگلیکوزیدی، فلوروکینولون ها، ماکرولیدها و گلیکوپتیدها به روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفتند. اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS آنالیز شد.

یافته های پژوهش: از ۹۱ جدایه تنها ۸ (۸/۷۹ درصد) دارای IS256 بودند. نتایج با روش میکروتیتراپلیمت نشان می دهد که توانایی اتصال در ۵۸ (۶۳/۷۳ درصد) فاقد اتصال، ۶ (۶/۶ درصد) ضعیف، ۱۴ (۱۵/۳۸ درصد) متوسط و ۱۳ (۱۴/۲۹ درصد) تولیدکننده بیوفیلیم قوی بودند. در جدایه های دارای IS256، ۶ (۷۵ درصد) فاقد اتصال، ۱ (۱۲/۵ درصد) ضعیف و ۱ (۱۲/۵ درصد) تولیدکننده بیوفیلیم متوسط بودند. جدایه های دارای IS256، ۳ (۳۷/۵ درصد) به جنتامایسین، ۲ (۲۵ درصد) به آمیکاسین، ۲ (۲۵ درصد) به استرپتومایسین، ۱ (۱۲/۵ درصد) به سیپروفلوکساسین، ۱ (۱۲/۵ درصد) به افلوکساسین و ۴ (۵۰ درصد) به اریترومایسین مقاوم بودند اما هیچ مقاومتی به وانکومایسین مشاهده نگردید. **بحث و نتیجه گیری:** نتایج حاکی از این است که ارتباطی بین IS256 و تشکیل بیوفیلیم وجود ندارد. مقاومت چندانی در جدایه های دارای IS256 به آمینوگلیکوزیدها مشاهده نگردید که کاملاً با نقش شناخته شده IS256 در ایجاد مقاومت آمینوگلیکوزیدی مغایرت دارد.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، بیوفیلیم، IS256، آمینوگلیکوزید

* نویسنده مسئول: گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران

Email: mehrabi.mehr@gmail

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس کوکسی گرم مثبت، خوشه ای شکل، کواگولاز منفی و فرصت طلب می باشد. این باکتری قابلیت رشد در غلظت های بالای نمک را دارد. این باکتری بخشی از فلور نرمال طبیعی پوست انسان است و در غشاهای مخاطی بسیاری از جانوران نیز دیده شده است. این باکتری در زمان سکونت بر روی پوست بیماری زا نیست اما اگر روی نواحی خاص مثل دریچه های مصنوعی قلب، مفاصل مصنوعی، شانت های مایع مغزی-نخاعی و یا بر روی کاتترهای وریدی و سوندهای ادراری قرار گیرد توانایی ایجاد بیماری را دارد (۱،۲).

بیماری های مهم استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در انسان شامل اندوکاردیت، سپتی سمی، عفونت زخم های جراحی، عفونت مفاصل مصنوعی، عفونت های شانت عصبی مرکزی و عفونت های وابسته به کاتترهای وریدی می باشد (۳).

باکتری توانایی ایجاد عفونت در افرادی را دارد که سیستم ایمنی آن ها ضعیف یا سرکوب شده است (۴). این باکتری ها از پوست بیمار یا از طریق پرسنل مراقبت های بهداشتی در هنگام قرارگیری تجهیزات پزشکی وارد جریان خون می شود به همین دلیل به عنوان شایع ترین علت ایجاد عفونت های بیمارستانی مطرح می شود (۵).

عامل بیماری زایی مهم در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به واسطه تشکیل بیوفیلیم توسط یک ادهسین بین سلولی پلی ساکاریدی می باشد که تولید این ادهسین بین سلولی پلی ساکاریدی در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس توسط اپرون ica که متشکل از ژن های icaA، icaD، icaB، icaC می باشد، تنظیم می شود (۶).

در تشکیل بیوفیلیم سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، بیان ica دستخوش یک روند تغییر فاز است که این تغییر فاز ممکن است بقای باکتری را بهبود دهد و اینکه بتوانند تحت تغییر شرایط زیست محیطی رشد کنند. تغییر فاز تشکیل بیوفیلیم توسط IS256 که یک توالی درج شونده کوتاه DNA و عنصر ژنتیکی متحرک و بسیار ساده است، انجام می شود که

اغلب در چندین نسخه در ژنوم استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس قابل تشخیص می باشد که اندازه آن ها ۱۳۰۰bp تا ۱۵۰۰bp هستند (۷،۸). IS256 اغلب در چندین نسخه بر روی کروموزوم استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس قرار دارد (۹).

بیماری زایی باکتری می تواند از طریق تنظیم کننده های ژن ica تنظیم شود و تغییر فاز بیماری زایی در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس می تواند توسط قرارگیری و برش عناصر درج شونده IS256 رخ دهد که باعث غیرفعال کردن اپرون icaADBC می شود (۱۰،۱۱). ظاهراً ژن icaC یک نقطه داغ (Hot Spot) را برای درج های IS256 نشان می دهد.

عنصر IS256 در میان اپرون ica قرار می گیرد. وقتی این عنصر در ژن icaC قرار گرفت باعث تنوع فاز می شود و در نتیجه به غیر فعال کردن تشکیل بیوفیلیم منجر می شود. اما این توالی IS256 می تواند از اپرون ica خارج شود و باکتری دوباره توانایی تشکیل بیوفیلیم را به دست آورد. توالی IS256 در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس هم چنین عامل مقاومت به آمینوگلیکوزیدها به واسطه ترانسپوزون Tn4001 می باشد (۴،۱۱). اما این عنصر می تواند به طور مستقل در نسخه های متعدد در ژنوم های استافیلوکوکوس ها و انتروکوکوس ها منجر به مقاومت به آمینوگلیکوزیدها گردد. توالی IS256 ممکن است بیان ژن های خاصی را تحت تاثیر قرار دهد که وابسته به بیماری زایی هستند. بنا بر این نوترکیبی دوباره ژنومی ناشی از قرارگیری و برش IS256 ممکن است سازگاری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در محیط بیمارستانی را افزایش دهد (۱۲). حضور نسخه های متعدد IS256 ممکن است یک نقش در انعطاف پذیری ژنوم چند مقاومتی و بازآرایی ژنوم در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس داشته باشند (۱۳).

توالی IS256 در ژنوم جنس های باکتری ها از جمله استافیلوکوکوس، انتروکوکوس، میکوباکتریوم، بورخولدریا، ریزوبیوم، ردوکوکوس، لاکتوباسیلوس و یرسینیا وجود دارد (۱۴).

در این تحقیق به بررسی باکتری های جدا شده از پوست و همین طور شیوع ژن IS256 و تشکیل

بیوفیلیم در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از پوست افراد سالم پرداخته شده است.

مواد و روش ها

در فاصله زمانی اردیبهشت و خرداد سال ۱۳۹۴، ۹۱ نمونه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس توسط سوآب استریل آغشته شده به سرم فیزیولوژی از سطح پوست افراد سالم جمع آوری شد. بدین ترتیب که سوآب استریل را بر روی سطح پوست افراد کشیده و آن ها را در محیط TSB و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده و سپس روی محیط بلادآگار کشت داده شد. جهت تشخیص از آزمون های بیوشیمیایی نظیر رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، کوآگولاز، تست DNase، تخمیر محیط مانیتول سالت آگار و حساسیت به نوویوسین استفاده شد. جدایه هایی که بر اساس نتایج آزمون های بیوشیمیایی انتخاب شدند برای تعیین دقیق تر جنس و گونه تحت آزمایش ملکولی 16SrRNA نیز قرار گرفتند.

استخراج DNA و روش PCR برای شناسایی ژن IS256؛ برای استخراج DNA ابتدا چندین کلنی از هر

جدایه را در ۱۲۰ میکرولیتر بافر TE حل کرده، سپس ۲۰ میکرولیتر آنزیم لیزواستافین را که از قبل با آب مقطر رقیق شده به این سوسپانسیون اضافه کرده و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور قرار داده، سپس نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموبلاک قرار گرفتند. بعد از آن نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و از مایع رویی به عنوان منبعی برای DNA استفاده شد.

واکنش PCR برای IS256 در حجم ۱۳ میکرولیتر انجام شد که شامل ۷ میکرولیتر مسترمیکس، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت و ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت اختصاصی، ۲ میکرولیتر آب مقطر تزریقی و ۲ میکرولیتر از DNA الگو بود.

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BIO RAD) انجام گرفت. توالی پرایمر و برنامه مورد استفاده برای تکثیر توالی درج شونده IS256 در جدول شماره ۱ و ۲ آورده شده است. برای مشاهده محصولات PCR از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد.

جدول شماره ۱. توالی پرایمر IS256 در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس

ژن	توالی پرایمر (۵' → ۳')	آمپلیکون (bp)	رفرنس
IS256	F: TGAAAAGCGAAGAGATTCAAAGC R: ATGTAGGTCCATAAGAACGGC	۱۱۰۳	(۷)

جدول شماره ۲. برنامه PCR مورد استفاده به منظور تکثیر IS256

تعداد سیکل	زمان	دما	مراحل
	۲ دقیقه	۹۵°C	شوک حرارتی اولیه
۲۵ سیکل	۳۰ ثانیه	۹۵°C	واشرشت شدن DNA (Denaturation)
	۳۰ ثانیه	۵۳/۹°C	جفت شدن پرایمر (Annealing)
	۴۰ ثانیه	۷۲°C	طولیل شدن پرایمر (Extension)
	۵ دقیقه	۷۲°C	طولیل شدن نهایی
	∞	۴°C	نگهداری

میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با کدورتی معادل استاندارد نیم مک فارلند در محیط TSB به هر چاهک اضافه شد (به منظور کاهش خطا و ارائه تجزیه تحلیل قابل اعتماد نتایج، برای هر جدایه باکتری حداقل سه چاهک در نظر گرفته شد). سپس پلیت ها به مدت ۴۸

توانایی تشکیل بیوفیلیم: به منظور توانایی تشکیل بیوفیلیم در جدایه ها از روش میکروتیتر پلیت (MTP) استفاده شد. ۱۸۰ میکرولیتر محیط تریپتی کیس سوی برات (TSB) حاوی یک درصد گلوکز درون چاهک های میکروتیتر پلیت ریخته شد. سپس ۲۰

آن گاه با اضافه کردن ۱۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه رنگ متصل شده به باکتری های موجود در بیوفیلیم را از آن ها جدا کرده و در طول موج ۴۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA reader (شرکت Awareness آمریکا)، حداکثر طول موج جذبی (OD) هر چاهک خوانده شد. توانایی تشکیل بیوفیلیم توسط جدایه های مورد بررسی بر مبنای میزان جذب سافرانین متصل شده به سلول های موجود در بیوفیلیم طبقه بندی گردیدند. با استفاده از روش محاسبه cut-off نتایج حاصل مورد بررسی قرار گرفت (جدول شماره ۳)(۱۵).

ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار داده شدند. برای حذف باکتری های متصل نشده، چاهک ها با استفاده از بافر PBS سه بار شست و شو داده شدند. آن گاه باکتری های موجود در بیوفیلیم در کف چاهک ها با استفاده از ۱۵۰ میکرولیتر متانول به مدت ۲۰ دقیقه ثابت شدند، سپس متانول باقی مانده را از پلیت ها خارج کرده و به مدت یک شب به منظور خشک شدن، در دمای اتاق قرار داده شدند. بعد از این مرحله، به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از ۱۵۰ میکرولیتر رنگ سافرانین یک درصد عمل رنگ آمیزی انجام شد و پلیت ها با استفاده از جریان آب تا خارج شدن کامل رنگ شست و شو شدند و در مجاورت هوا خشک شدند.

جدول شماره ۳. طبقه بندی توانایی تشکیل بیوفیلیم به وسیله روش میکروتیتر پلیت (۱۵)

توانایی تشکیل بیوفیلیم	محاسبه میزان cut-off	نتایج حاصل از میانگین حداکثر جذب نور (OD)
قوی	$OD > 4 \times OD_c$	$OD > 0.9252$
متوسط	$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	$0.4626 < OD \leq 0.9252$
ضعیف	$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	$0.2313 < OD \leq 0.4626$
عدم اتصال	$OD \leq 0.08324$	$OD < 0.2313$

* OD_c = میانگین جذب نوری چاهک های کنترل منفی + (۳ × انحراف معیار چاهک های کنترل منفی)

جدایه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس با فاکتورهای سن، حضور ژن IS256 و مقاومت آنتی بیوتیکی تعیین گردید.

یافته های پژوهش

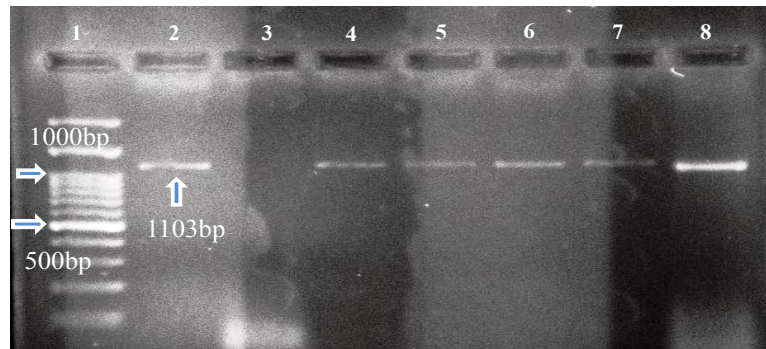
از ۹۱ جدایه جمع آوری شده، ۴۳ (۴۷/۲۵ درصد) مورد مربوط به زنان و ۴۸ (۵۲/۷۵ درصد) مورد مربوط به مردان بود. نتایج حاصل از PCR نشان داد که از این ۹۱ جدایه، تنها ۸ (۸/۷۹ درصد) دارای IS256 بودند (شکل شماره ۱). از ۹۱ جدایه، ۵۸ (۶۳/۷۳ درصد) فاقد توانایی تشکیل بیوفیلیم، ۶ (۶/۶ درصد) بیوفیلیم ضعیف، ۱۴ (۱۵/۳۸ درصد) بیوفیلیم متوسط و ۱۳ (۱۴/۲۹ درصد) بیوفیلیم قوی تشکیل دادند. جدایه هایی که دارای IS256 بودند ۶ (۷۵ درصد) فاقد توانایی تشکیل بیوفیلیم، ۱ (۱۲/۵ درصد) بیوفیلیم ضعیف و ۱ (۱۲/۵ درصد) بیوفیلیم متوسط تشکیل دادند. از ۸۳ (۹۱/۲۱ درصد) جدایه هایی که فاقد IS256 بودند، ۵۲ (۶۲/۶۵ درصد) جدایه ها فاقد توانایی تشکیل بیوفیلیم، ۱۳ (۶/۰۳ درصد) دارای بیوفیلیم ضعیف، ۱۳ (۱۵/۶۶

آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی: برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه های مورد بررسی نسبت به ۸ آنتی بیوتیک آمیکاسین، جنتامایسین، استرپتومایسین، سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، اریترومایسین و وانکومایسین از روش دیسک دیفیوژن طبق دستورالعمل انستیتو استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) استفاده شد. در این روش سوسپانسیون از باکتری با کدورتی معادل استاندارد نیم مک فارلند در محیط مولر هینتون برات تهیه گردید، سپس با استفاده از سوآب استریل روی سطح محیط مولر هینتون آگار تلقیح و دیسک ها با فاصله مناسب روی سطح محیط قرار داده شدند. هاله عدم رشد هر یک از دیسک ها بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد اندازه گیری شدند.

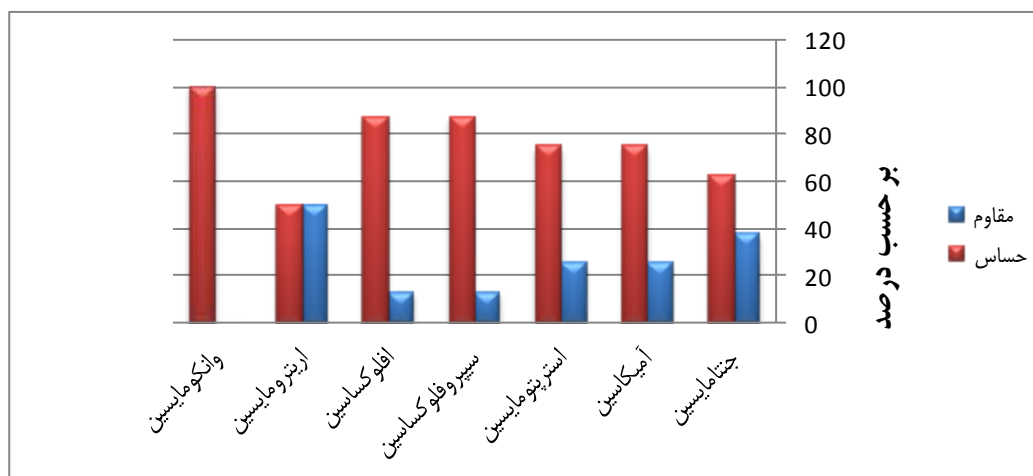
اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ و آزمون آماری کای مربع و آزمون دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) آنالیز شد و ارتباط آماری بین توانایی تشکیل بیوفیلیم در

جتنامیاسین و اریترومیاسین در جدایه های واجد IS256 اختلاف معناداری یافت نشد ($P>0.05$). اختلاف آماری معناداری بین توانایی تشکیل بیوفیلم در جدایه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس با فاکتور جنس در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P=0.008$) با آزمون کای مربع مشاهده شد. ارتباط بین تشکیل بیوفیلم در ۹۱ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از پوست افراد سالم و سن، جنس و حضور ژن IS256 در جدول شماره ۴ ارائه شده است.

درصد دارای بیوفیلم متوسط و ۱۳ (۱۵/۶۶ درصد) بیوفیلم قوی تشکیل داده بودند. جدایه هایی که دارای IS256 بودند ۳ (۳۷/۵ درصد) به جتنامیاسین، ۲ (۲۵ درصد) به آمیکاسین، ۲ (۲۵ درصد) به استرپتومیاسین، ۱ (۱۲/۵ درصد) به سیپروفلوکساسین، ۱ (۱۲/۵ درصد) به افلوکساسین و ۴ (۵۰ درصد) به اریترومیاسین مقاوم بودند اما هیچ مقاومتی به وانکومیاسین مشاهده نگردید (نمودار شماره ۱). بین تشکیل بیوفیلم و حضور IS256 و هم چنین مقاومت به آنتی بیوتیک های آمیکاسین، افلوکساسین، سیپروفلوکساسین، استرپتومیاسین،



شکل شماره ۱. ژل الکتروفورز محصول PCR نمونه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از نظر IS256: ستون شماره ۱ مربوط به DNA Ladder 100bp (شرکت سیناکلون)، ستون شماره ۲ کنترل مثبت (RP62A)، ستون شماره ۳ کنترل منفی (آب مقطر)، ستون شماره ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ مربوط به جدایه های دارای IS256 با وزن مولکولی ۱۱۰۳bp می باشد.



نمودار شماره ۱. بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی در جدایه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس واجد IS256

جدول شماره 4. ارتباط بین تشکیل بیوفیلیم در جدایه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از افراد سالم و حضور IS256

P	تعداد (%)		تعداد (%)		تعداد (%)		تعداد (%)		تشکیل بیوفیلیم	خصوصیات
	جمع	عدم تشکیل بیوفیلیم	بیوفیلیم ضعیف	بیوفیلیم متوسط	بیوفیلیم قوی	تشکیل بیوفیلیم	خصوصیات			
.008	۴۸ (۵۲/۷۵)	۳۷ (۴۰/۶۶)	۳ (۳/۳۰)	۲ (۲/۲۰)	۶ (۶/۵۹)	مرد	جنس			
	۴۳ (۴۷/۲۵)	۲۱ (۲۳/۰۷)	۳ (۳/۳۰)	۱۲ (۱۳/۱۸)	۷ (۷/۷۰)	زن	جنس			
.۳۴۹	۸۶ (۱۰۰)	۵۶ (۶۵/۱۱)	۵ (۵/۸۱)	۱۳ (۱۵/۱۱)	۱۲ (۱۳/۹۵)	۱۹-۴۰	سن (سال)			
	۵ (۰)	۲ (۴۰)	۱ (۲۰)	۱ (۲۰)	۱ (۲۰)	>۴۰	سن (سال)			
=1	۸ (۸/۷۹)	۶ (۷۵)	۱ (۱۲/۰۵)	۱ (۱۲/۰۵)	۰ (۰)	دارد	IS256			
	۸۳ (۹۱/۲۱)	۵۲ (۶۲/۶۵)	۵ (۶/۰۳)	۱۳ (۱۵/۶۶)	۱۳ (۱۵/۶۶)	ندارد	IS256			

بحث و نتیجه گیری

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در دهه اخیر به عنوان باکتری های بیماری زا نقش بسیار مهمی را در ایجاد عفونت بیمارستانی ایفا نموده اند (۳). بیشترین عفونت های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در تجهیزات پزشکی کار گذاشته در بدن و به طور نمونه در بیوفیلیم تشکیل شده رخ می دهد (۱۶). تشکیل بیوفیلیم یکی از عوامل بیماری زا می باشد که با تشکیل بیوفیلیم باکتری در مقابل عوامل ضد میکروبی و سیستم ایمنی میزبان محافظت می شود و باعث تداوم عفونت های ایجاد شده توسط بیوفیلیم می شود و می توانند ۱۰۰۰ برابر به آنتی بیوتیک ها و سایر عوامل ضد میکروبی به خصوص نسبت به همتایان پلانکتونی خود، مقاوم تر باشند (۱۷). در مطالعه حاضر از ۹۱ جدایه، ۸ (۸/۷۹ درصد) دارای IS256 بودند که از این ۹۱ جدایه، ۵۸ (۶۳/۷۳ درصد) فاقد توانایی تشکیل بیوفیلیم، ۶ (۶/۶ درصد) بیوفیلیم ضعیف، ۱۴ (۱۵/۳۸ درصد) بیوفیلیم متوسط و ۱۳ (۱۴/۲۹ درصد) بیوفیلیم قوی تشکیل دادند که عدم تشکیل بیوفیلیم در این جدایه ها بیشتر بود. در جدایه های دارای IS256 ۶ (۷۵ درصد) فاقد توانایی تشکیل بیوفیلیم، ۱ (۱۲/۵ درصد) بیوفیلیم ضعیف و ۱ (۱۲/۵ درصد) بیوفیلیم متوسط تشکیل دادند که نشان می دهد عدم تشکیل بیوفیلیم نیز در این جدایه ها بیشتر می باشد که این نتایج با مطالعات گذشته که بیان می کند IS256 باعث عدم تشکیل بیوفیلیم می شود (۱۸) هم خوانی دارد به این صورت که IS256 در میان اپرون ica قرار می گیرد و باعث غیرفعال کردن اپرون ica و عدم تشکیل بیوفیلیم می گردد (۱۱). اما در مطالعه حاضر نشان داده شده از ۸۳ (۹۱/۲۱)

درصد) فاقد IS256، ۵۲ (۶۲/۶۵ درصد) فاقد توانایی تشکیل بیوفیلیم، ۵ (۶/۰۳ درصد) دارای بیوفیلیم ضعیف، ۱۳ (۱۵/۶۶ درصد) دارای بیوفیلیم متوسط و ۱۳ (۱۵/۶۶ درصد) بیوفیلیم قوی می باشند که عدم تشکیل بیوفیلیم نیز در این جدایه ها بیشتر می باشد که این می تواند با نقش گزارش شده IS256 مغایرت داشته باشد. همان طور که در مطالعه حاضر نشان داده شده است، ارتباطی بین IS256 و تشکیل بیوفیلیم وجود ندارد شاید حضور IS256 در عدم تشکیل بیوفیلیم نقش داشته باشد اما احتمالاً مکانیسم ها و عوامل دیگری به غیر از IS256 وجود دارد که باعث می شود بیوفیلیم تشکیل نگردد و یا ممکن است ژن های مربوط به اپرون ica برای تشکیل بیوفیلیم، در جدایه ها حضور نداشته باشند. طبق تحقیقات جدایه های دارای IS256 به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی مقاومت نشان می دهند (۱۳) ولی در تحقیق حاضر حساسیت به آمینوگلیکوزیدها بیشتر بود که با نقش شناخته شده IS256 در ایجاد مقاومت آمینوگلیکوزیدی مغایرت دارد که امکان دارد به دلیل شرایط فیزیولوژیکی باکتری و دیگر عوامل باشد زیرا که تحقیق حاضر بر روی نمونه های پوست انجام گرفته است و با توجه به این که تاکنون تحقیقات گسترده ای بر روی مقاومت آمینوگلیکوزیدی جدایه های دارای IS256 از پوست افراد سالم و ارتباط آن ها با یکدیگر انجام پذیرفته است پس مستندات وجود ندارد که بتوان آن ها را با تحقیق حاضر مطابقت داد و نمی توان نتایج قابل تاملی را ارائه داد.

در تحقیق حاضر همه جدایه ها به وانکومایسین حساسیت نشان دادند که با تحقیقات گذشته هم خوانی

جدایه های بیماری زا و تهاجمی از جدایه های آلوده کننده فلور نرمال و غیر بیماری زا و هم چنین نقش IS256 و دیگر عوامل متعدد در عدم تشکیل بیوفیلم می تواند کمک شایانی در کنترل بیماری زایی این باکتری ها داشته باشد.

دارد. با این حال نمی توان در خصوص مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیکی نظر قطعی داد زیرا در تحقیق حاضر فقط جدایه های دارای IS256 از نظر مقاومت آنتی بیوتیکی بررسی شدند و همه جدایه ها مورد بررسی قرار نگرفتند. توانایی تمایز و تشخیص

References

1. Sjolund M, Tano E, Blaser MJ, Andersson DI, Engstrand L. Persistence of resistant *Staphylococcus epidermidis* after single course of clarithromycin. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1389-92.
2. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* the accidental pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7:555-67.
3. Moriarty F, Zaat SA, Busscher HJ. Biomaterials associated infection immunological aspects and antimicrobial strategies. Springer Publication.2013; P.25-56.
4. Kozitskaya S, Olson ME, Fey PD, Witte W, Ohlsen K, Ziebuhr W. Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm mediating genes by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2005; 43:4751-7.
5. Conlan S, Mijares LA, Becker J, Blakesley RW, Bouffard GG, Brooks S, et al. *Staphylococcus epidermidis* pan-genome sequence analysis reveals diversity of skin commensal and hospital infection-associated isolates. *Genome Biol* 2012; 13: 64.
6. Eftekhari F, Mirmohamadi Z. [Evaluation of biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates from nosocomial infections and skin of healthy volunteers]. *Int J Med Med Sci* 2009; 1:438-41. (Persian)
7. Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, Lobner I, Gotz F, Hacker J. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis* evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol* 1999; 32:345-56.
8. Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62:725-74.
9. Koskela A, Nilsson A, Persson L, Soderquist B. Prevalence of the *ica* operon and insertion sequence IS256 among *Staphylococcus epidermidis* prosthetic joint infection isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 655-60.
10. Zhang YQ, Ren SX, Li HL, Wang YX, Fu G, Yang J, et al. Genome based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain. *Mol Microbiol* 2003; 49:1577-93.
11. Loessner I, Dietrich K, Dietrich D, Hacker J, Ziebuhr W. Transposase dependent formation of circular IS256 derivatives in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2002; 184:4709-14.
12. Gu J, Li H, Li M, Vuong C, Otto M, Wen Y, et al. Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of *Staphylococcus epidermidis*. *J Hos Infect* 2005; 61:342-8.
13. Kozitskaya S, Cho SH, Dietrich K, Marre R, Naber K, Ziebuhr W. The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infect Immun* 2004; 72:1210-15.
14. Hennig S, Ziebuhr W. Characterization of the transposase encoded by IS256 the prototype of a major family of bacterial insertion sequence elements. *J Bacteriol* 2010; 192:4153-63.
15. Mirzaee M, Najari Peerayeh Sh, Behmanesh M, Forouzandeh Moghadam M, Ghasemian AM. [Biofilm formation and presence of *ica* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from intensive care unit]. *J Mazandaran Uni Med Sci* 2014; 24:43-51. (Persian)

16. Vuong C, Voyich JM, Fischer ER, Braughton KR, Whitney AR, DeLeo FR, et al. Polysaccharide intercellular adhesin protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol* 2004; 6:269-75.

17. Mendezvilas A. Science against microbial pathogens. *Com Current Res Technol Adv Cent* 2013; 2: 978-84.

18. Juarez MA, Ramon ML, Flores LA, Camarillo O, Zenteno JC, Janroblero J, et al. *Staphylococcus epidermidis* with the *icaA-icaD-IS256* genotype and protein or protein extracellular DNA biofilm is frequent in ocular infections. *J Med Microbiol* 2013; 62:1579-87.



A Study on the Prevalence of IS256 Insertion Sequence and Biofilm Formation in Staphylococcus Epidermidis Isolated from Healthy Human Skin

Goudarzi M¹, Mehrabi M²*, Mirzaee M²

(Received: April 4, 2016

Accepted: November 22, 2016)

Abstract

Introduction: Biofilm formation mediated by a polysaccharide intercellular adhesin (PIA) is considered a major pathogenic factor of staphylococcus epidermidis. PIA production is regulated by icaADBC operon. IS256 causes phase variation of biofilm formation by inactivation of ica operon. This study was aimed at investigating the prevalence of IS256 and biofilm formation in staphylococcus epidermidis isolated from healthy human skin.

Materials & Methods: 91 isolates of staphylococcus epidermidis were collected from the surface of healthy human skin. All the isolates were examined in terms of ability of biofilm formation by Microtiter plate assay. PCR technique with specific primers was used to determine the presence of IS256. Additionally, all the isolates containing IS256 were examined in term of aminoglycoside resistance, fluoroquinolones, macrolides, and glycopeptides by disk diffusion method. Data were analyzed using SPSS software.

Findings: Out of the 91 isolates, only 8 (8/79%) cases contained IS256. The microtiter plate assay results showed that attachment abilities 58 (63/73%) lacked, 6 (6/6%) were weak, 14 (15/38%) were moderate and 13 (14/29%) were strong biofilm producers. The isolates containing IS256, 6 (75%) lacked, 1 (12/5%) was weak, and 1(12/5%) was moderate biofilm producer. The isolates containing IS256, 3 (37/5%) were resistant to gentamicin, 2 (25%) to amikacin, 2 (25%) to streptomycin, 1(12/5%) to ciprofloxacin, 1(12/5%) to ofloxacin and 4 (50%) were resistant to erythromycin, but no resistance to vancomycin was observed.

Discussion & Conclusions: The results demonstrated no relation between the IS256 and biofilm formation. Not much resistance to aminoglycosides was observed in isolates containing IS256. This is quite incompatible with the so-called role of IS256 in forming aminoglycoside resistance.

Keywords: staphylococcus epidermidis, biofilm, IS256, aminoglycoside

1. Dept of Microbiology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran

2. Dept of Laboratory Sciences, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Broujerd, Iran

* Corresponding author Email: mehrabi.mehr@gmail.com