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

معصومه گودرزی[۱]، محمدرضا مهرابی[۲*]، محسن میرزایی[۲]

۱) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران

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

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲

چکیده

مقدمه: مهم ترین عامل بیماری زایی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به واسطه تشکیل بیوفیلم توسط یک ادهسین بین سلولی پلی ساکاریدی می باشد که تولید آن توسط اپرون icaADBC تنظیم می گردد. IS256 باعث تغییر فاز تشکیل بیوفیلم توسط غیر فعال کردن اپرون ica می شود. هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع IS256 و تشکیل بیوفیلم 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 بیوفیلم به روش میکروتیترپلیت 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 گلیکوپپتیدها 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 میکروتیتر پلیت 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 (۱۴/۲۹درصد) تولیدکننده بیوفیلم قوی بودند. در جدایه های دارای IS256، ۶ (۷۵ درصد) فاقد اتصال، ۱ (۱۲/۵ درصد) ضعیف و ۱ (۱۲/۵ درصد) تولیدکننده بیوفیلم 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 بیوفیلم 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، بیوفیلم، 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-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.85]

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 بیوفیلم 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 بیوفیلم 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 بیوفیلم 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 بیوفیلم منجر می شود. اما این توالی IS256 می تواند از اپرون ica خارج شود و باکتری دوباره توانایی تشکیل بیوفیلم را به دست آورد. توالی IS256 در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس هم چنین عامل مقاومت به آمینوگلیکوزیدها به واسطه ترنسپوزون 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، مایکوباکتریوم، بورخولدریا، ریزوبیوم، ردوکوکوس، لاکتوباسیلوس و یرسینیا وجود دارد(۱۴).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.85]

در این تحقیق به بررسی باکتری های جدا شده از پوست و همین طور شیوع ژن IS256 و تشکیل بیوفیلم 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 نوبیوسین 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('۳ → '۵)	آمپلیکون(bp)	رفرنس
IS256	F: TGAAAAGCGAAGAGATTCAAAGC R: ATGTAGGTCCATAAGAACGGC	۱۱۰۳	(۷)

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

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

توانایی تشکیل بیوفیلم: به منظور توانایی تشکیل بیوفیلم در جدایه ها از روش میکروتیتر پلیت(MTP) استفاده شد. ۱۸۰ میکرولیتر محیط تریپتی کیس سوی براث(TSB) حاوی یک درصد گلوکز درون چاهک های میکروتیترپلیت ریخته شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با کدورتی معادل

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.85]

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 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 بیوفیلم 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، آن گاه با اضافه کردن ۱۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه رنگ متصل شده به باکتری های موجود در بیوفیلم 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 بیوفیلم توسط جدایه های مورد بررسی بر مبنای میزان جذب سافرانین متصل شده به سلول های موجود در بیوفیلم طبقه بندی گردیدند. با استفاده از روش محاسبه cut-off نتایج حاصل مورد بررسی قرار گرفت(جدول شماره ۳)(۱۵).

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

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

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

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 سوسپانسیونی از باکتری با کدورتی معادل استاندارد نیم مک فارلند در محیط مولر هینتون براث 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 اندازه‌گیری 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 بیوفیلم در جدایه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس با فاکتورهای سن، حضور ژن IS256 و مقاومت آنتی بیوتیکی تعیین گردید.

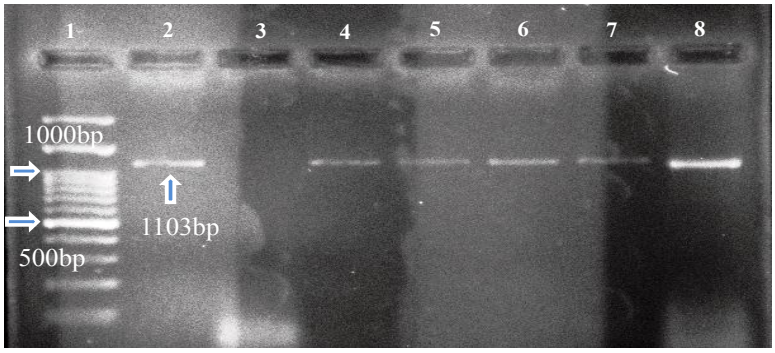
یافته های پژوهش

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 بیوفیلم، ۶ (۶/۶ درصد) بیوفیلم ضعیف، ۱۴ (۱۵/۳۸ درصد) بیوفیلم متوسط و ۱۳ (۱۴/۲۹ درصد) بیوفیلم قوی تشکیل دادند. جدایه هایی که دارای IS256 بودند ۶ (۷۵ درصد) فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم، ۱ (۱۲/۵ درصد) بیوفیلم ضعیف و ۱

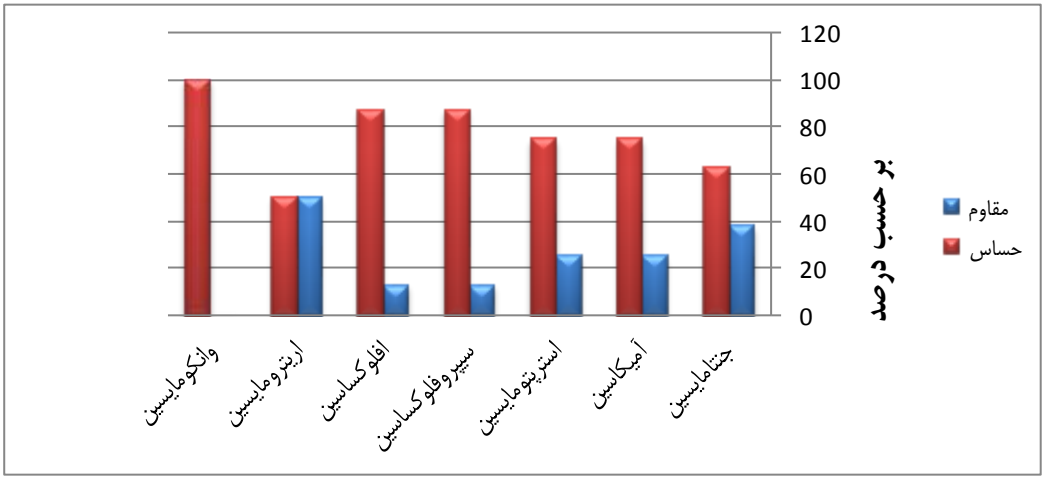
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.85]

(۱۲/۵ درصد) بیوفیلم متوسط تشکیل دادند. از ۸۳ (۹۱/۲۱ درصد) جدایه هایی که فاقد IS256 بودند، ۵۲ (۶۲/۶۵ درصد) جدایه ها فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم، ۵ (۶/۰۳ درصد) دارای بیوفیلم ضعیف، ۱۳ (۱۵/۶۶ 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 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 (نمودار شماره ۱). بین تشکیل بیوفیلم و حضور IS256 و هم چنین مقاومت به آنتی بیوتیک های آمیکاسین، افلوکساسین، سیپروفلوکساسین، استرپتومایسین، جنتامایسین و اریترومایسین 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.



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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.85]

جدول شماره ۴. ارتباط بین تشکیل بیوفیلم در جدایه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از افراد سالم و حضور IS256

تشکیل بیوفیلم / خصوصیات		بیوفیلم قوی تعداد (٪)	بیوفیلم متوسط تعداد (٪)	بیوفیلم ضعیف تعداد (٪)	عدم تشکیل بیوفیلم تعداد (٪)	جمع تعداد (٪)	P
جنس	مرد	۶ (۶/۵۹)	۲ (۲/۲۰)	۳ (۳/۳۰)	۳۷ (۴۰/۶۶)	۴۸ (۵۲/۷۵)	۰/۰۰۸
	زن	۷ (۷/۷۰)	۱۲ (۱۳/۱۸)	۳ (۳/۳۰)	۲۱ (۲۳/۰۷)	۴۳ (۴۷/۲۵)	
سن (سال)	۱۹-۴۰	۱۲ (۱۳/۹۵)	۱۳ (۱۵/۱۱)	۵ (۵/۸۱)	۵۶ (۶۵/۱۱)	۸۶ (۱۰۰)	۰/۳۴۹
	>۴۰	۱ (۲۰)	۱ (۲۰)	۱ (۲۰)	۲ (۴۰)	۵ (۰)	
IS256	دارد	۰ (۰)	۱ (۱۲/۰۵)	۱ (۱۲/۰۵)	۶ (۷۵)	۸ (۸/۷۹)	≅۱
	ندارد	۱۳ (۱۵/۶۶)	۱۳ (۱۵/۶۶)	۵ (۶/۰۳)	۵۲ (۶۲/۶۵)	۸۳ (۹۱/۲۱)	

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 بیوفیلم تشکیل شده رخ می‌دهد (۱۶). تشکیل بیوفیلم یکی از عوامل بیماری زایی می باشد که با تشکیل بیوفیلم باکتری در مقابل عوامل ضد میکروبی و سیستم ایمنی میزبان محافظت می شود و باعث تداوم عفونت های ایجاد شده توسط بیوفیلم 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 بیوفیلم، ۶ (۶/۶ درصد) بیوفیلم ضعیف، ۱۴ (۱۵/۳۸ درصد) بیوفیلم متوسط و ۱۳ (۱۴/۲۹ درصد) بیوفیلم قوی تشکیل دادند که عدم تشکیل بیوفیلم در این جدایه ها بیشتر بود. در جدایه های دارای IS256 ۶ (۷۵ درصد) فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم، ۱ (۱۲/۵درصد) بیوفیلم ضعیف و ۱ (۱۲/۵ درصد) بیوفیلم متوسط تشکیل دادند که نشان می دهد عدم تشکیل بیوفیلم نیز در این جدایه ها بیشتر می باشد که این نتایج با مطالعات گذشته که بیان می کند IS256 باعث عدم تشکیل بیوفیلم 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 بیوفیلم می گردد(۱۱).

اما در مطالعه حاضر نشان داده شده از ۸۳ (۹۱/۲۱ درصد) فاقد IS256، ۵۲ (۶۲/۶۵ درصد) فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم، ۵ (۶/۰۳ درصد) دارای بیوفیلم ضعیف، ۱۳ (۱۵/۶۶ درصد) دارای بیوفیلم متوسط و ۱۳ (۱۵/۶۶ درصد) بیوفیلم قوی می باشند که عدم تشکیل بیوفیلم 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 بیوفیلم وجود ندارد شاید حضور IS256 در عدم تشکیل بیوفیلم نقش داشته باشد اما احتمالاً مکانیسم ها و عوامل دیگری به غیر از IS256 وجود دارد که باعث می شود بیوفیلم تشکیل نگردد و یا ممکن است ژن های مربوط به اپرون ica برای تشکیل بیوفیلم، 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 نپذیرفته است پس مستنداتی وجود ندارد که بتوان آن ها را با تحقیق حاضر مطابقت داد و نمی توان نتایج قابل تاملی را ارائه داد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.85]

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

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. Eftekhar 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, Nilsdotter 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, Dittrich 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, Najar Peerayeh Sh, Behmanesh M, Forouzandeh Moghadam M, Ghasemian AM. [Biofilm formation and presence of ica genes in Staphylococcus

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.85]

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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.85]

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

*Goudarzi M[1], Mehrabi M[2] *, Mirzaee M[2]*

(Received: April 4, 2016 Accepted: November 22, 2016)

Abstract

Introduction: The major pathogenic factor of Staphylococcus epidermidis is biofilm formation mediated by a Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA). PIA production is regulated by the icaADBC operon. IS256 causes phase variation of biofilm formation by inactivation ica operon. This study aims at investigating the prevalence of IS256 and biofilm formation in Staphylococcus epidermidis isolated from healthy human skin.

Materials & Methods: Ninety one isolates of Staphylococcus epidermidis were collected from the surface of healthy human skin. All 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 IS2556. Additionally, all 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: From 91 isolates, only 8 (8/79%) isolates 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 producer. Isolates containing IS256, 6 (75%) lacked, 1 (12/5%) were weak, and 1(12/5%) were moderate biofilm producer. Isolates containing IS256, 3 (37/5%) were resistance to gentamicin, 2 (25%) to amikacin, 2 (25%) to streptomycin, 1(12/5%) to ciprofloxacin, 1(12/5%) to ofloxacin and 4 (50%) were resistance to erythromycin, but no resistance to vancomycin was observed.

Discussion & Conclusions: The findings show that there is no connection between the IS256 and biofilm formation. Not match resistance to aminoglycosides was observed in isolates containing IS256 hich 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*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.1.85]