فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۸، تابستان ۱۳۹۵، صفحه ۱۱۶- ۱۰۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۰۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۱۳

تولید بیوفیلم در میان سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* جداسازی‌شده از افراد سالم

فاتح رحیمی *: استادیار باکتری‌شناسی، دانشگاه اصفهان، ایران، f.rahimi@sci.ui.sc.ir
محمدرضا عربستانی: استادیار باکتری‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، ایران، mohammad.arabestani@gmail.com

چکیده

مقدمه: *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* به‌عنوان باکتری بیماری‌زای بیمارستانی شناخته می‌شود که به‌علت تشکیل بیوفیلم در بیماران و افراد سالم مهم است. این مطالعه با هدف بررسی تولید بیوفیلم در میان سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* جداسازی‌شده از افراد سالم در طی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۲ به انجام رسیده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه در مجموع ۲۰۰ فرد سالم انتخاب شدند. با استفاده از سوآب استریل، نمونه‌گیری از ناحیهٔ بازو، ساعد و زیربغل این افراد انجام گرفت و سوآب‌ها به محیط آبگوشت تایوگلیکولات انتقال داده شدند. سپس نمونه‌ها بر روی محیط ژلوز مانیتول نمک کشت شدند و شناسایی سویه‌ها تا حد گونه با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی انجام گرفت. برای تعیین تولید بیوفیلم از روش کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت استفاده شد و حضور ژن‌های *icaA* و *icaD* با استفاده از آزمون واکنش زنجیره‌ای آنزیم پلیمراز مشخص شد.

نتایج: در مجموع ۱۰۴ سویهٔ *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* از افراد سالم جداسازی شد که ۶۶ (۶۳درصد) سویه به عنوان سویه‌های مولد بیوفیلم و ۳۸ (۳۷درصد) سویه نیز به عنوان بیوفیلم منفی شناسایی شدند. در تمامی ۶۶ سویهٔ مدنظر، هر دو ژن *icaA* و *icaD* شناسایی شدند.

بحث و نتیجه‌گیری: شیوع سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* مولد بیوفیلم در میان افراد سالم نشان‌دهندهٔ کلونیزه‌شدن این افراد با سویه‌های بیمارستانی است. شیوع چنین سویه‌هایی خطری جدی برای سلامت جامعه است.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس*، بیوفیلم، افراد سالم

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی[1] از جمله فراوان ترین میکروارگانیسم‌های جداسازی‌شده از نمونه‌های بالینی در آزمایشگاه‌ها هستند (۱). به دلیل حضور این ارگانیسم‌ها 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، خصوصاً در محیط بیمارستان‌ها اهمیت زیادی پیدا کرده‌اند (۲). امروزه استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی، از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی هستند، به‌طوری‌که مطالعات مختلف نشان می‌دهند، بیش از ۳۰درصد موارد باکتریمی بیمارستانی را این باکتری‌ها ایجاد می‌کنند (۳). این باکتری‌ها معمولاً باعث ایجاد عفونت در نوزادان و افراد دارای نقص سیستم ایمنی می‌شوند و عفونت‌هایی که این ارگانیسم‌ها ایجاد می‌کنند، عمدتاً در ارتباط با وسایل خارجی درون بدن بیماران، مانند سوندهای داخل وریدی، شانت‌های مغزی- نخاعی، دریچه‌های مصنوعی قلب و مفاصل مصنوعی هستند (۴).

استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی مشتمل بر چندین گونه هستند که از نظر همه‌گیرشناسی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بیماری‌زایی با یکدیگر تفاوت دارند. در گذشته، این تصور وجود داشت که شناسایی این دسته از باکتری‌ها تا حد گونه ضروری نیست و تأثیری در درمان عفونت‌های ناشی از آن‌ها ندارد (۵). مطالعات بیشتر نشان داد که تعیین گونهٔ این ارگانیسم‌ها برای شناخت پتانسیل بیماری‌زایی آن‌ها امری ضروری است که علاوه بر مشخص‌کردن اهمیت بالینی و بیماری‌های مرتبط با هر گونه، می‌تواند در درمان و تجویز آنتی‌بیوتیک مناسب نیز، بسیار مفید باشد. به همین دلیل، امروزه با گسترش عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی، تعیین گونهٔ این باکتری‌ها در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی امری مهم است (۶). *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* به‌عنوان یکی از عوامل مهم ایجاد عفونت‌های بیمارستانی در جهان شناخته می شود و عوامل مستعدکننده‌ای نظیر سوندگذاری، استفاده از پروتز و پیوند دریچهٔ مصنوعی قلب، خطر ابتلا به عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* را افزایش می‌دهند (۷).

باکتری‌ها می‌توانند به‌صورت بیوفیلم در سطح سوندها و سوندهای ادراری رشد کنند و مقاومت فوق‌العاده‌ای نسبت به عوامل ضدمیکروبی از خود نشان دهند (۸). *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* به‌عنوان مهم ترین گونهٔ *استافیلوکوکوس* در تولید بیوفیلم به‌خصوص در دستگاه ادراری شناخته می شد، اما در حال حاضر، *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اغلب به‌عنوان مهم‌ترین عوامل ایجاد بیوفیلم در بیماران دارای عفونت ادراری حائز اهمیت هستند (۸-۱۰). بیوفیلم‌های باکتریایی در بیمارانی که از ابزارهای خارجی استفاده می کنند یک فرآیند دومرحله‌ای است که مشتمل بر اتصال به سطوح، رشد، تکثیر و گسترش باکتری ها به‌شکل چند لایه است (۹). تشکیل بیوفیلم منجر به ایجاد عفونت‌های عودشونده می‌شود که نسبت به درمان‌های ضدمیکروبی مقاومت نشان می‌دهد و باعث افزایش هزینه‌های ناشی از درمان می‌شود (۱۱). تولید بیوفیلم ناشی از فعالیت اپرون *icaADBC* است که مسئول سنتز بخش عمده‌ای از ماتریکس اگزوپلی‌ساکاریدی، پلی‌ساکارید چسبندهٔ بین سلولی[2] و عامل گردِهم‌آمدن سلول‌های باکتریایی در بیوفیلم است

(۱۲). علاوه‌براین، تولید اتولایزین و پروتئین سطحی نیز در تشکیل بیوفیلم حائز اهمیت است (۱۳). این مطالعه با هدف بررسی سویه های *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* مولد بیوفیلم جداسازی‌شده از افراد سالم به انجام رسیده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: جهت انجام این مطالعه در طی سال های ۱۳۹۳-۱۳۹۲ در مجموع ۲۰۰ فرد سالم که دارای ۳ ویژگی زیر بودند، انتخاب شدند: ۱. در طی ۶ ماه گذشته به پزشک یا مرکز درمانی مراجعه نکرده‌اند؛ ۲. در طی ۶ ماه گذشته آنتی‌بیوتیک مصرف نکرده‌اند و ۳. در طی ۶ ماه گذشته با بیماری که در بیمارستان یا مرکز درمانی بستری بوده است سروکار نداشته‌اند. برای این منظور با استفاده از سوآب آغشته به سرم فیزیولوژی استریل، از نواحی ساعد، بازو و زیربغل (دست غیرغالب) افراد نمونه‌گیری به عمل آمد و سپس سوآب‌ها به محیط آبگوشت تایوگلیکولات[۳] (مرک، آلمان[۴]) منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، نمونه‌ها بر روی محیط ژلوز مانیتول نمک[۵] (مرک، آلمان) کشت داده شدند. تمامی جدایه‌ها در ابتدا با استفاده از آزمون‌های کاتالاز، رنگ‌آمیزی گرم، کواگولاز، مقاومت به دیسک باسیتراسین و دی ان آز[۶] به‌عنوان جدایه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی بررسی و تأیید شدند (۱۴). سپس با استفاده از آزمون‌های پی وای آر[۷]، دیسک نووبیوسین، آزمون دکربوکسیلاسیون اورنیتین، تولید اسید از قندهای مالتوز، ترهالوز، سوکروز و مانیتول تا حد گونه (*استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس*) شناسایی شدند (۱۵).

بررسی تولید بیوفیلم:

الف: به روش کیفی: جهت تعیین سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* مولد بیوفیلم، سویه‌ها بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو[۸] دارای ۴۰ گرم در لیتر سوکروز کشت داده شدند و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند (۱۶). کلنی‌های سیاه‌رنگ به‌عنوان سویه‌های مولد بیوفیلم و کلنی‌های قرمزِ تیره به‌عنوان سویه‌های مولد بیوفیلم ضعیف و سویه‌های قرمزِ روشن تا صورتی به‌عنوان سویه‌های فاقد قدرت تولید بیوفیلم شناسایی شدند (۱۶).

ب: به‌روش کمی میکروتیتر پلیت: این روش مبتنی بر سنجش میزان بیوفیلم تولیدی در محیط آبگوشت تریپتیکاز سوی[۹] دارای ۰/۲۵درصد سوکروز و در میکروپلیت‌های ۹۶خانه (گرینر، آمریکا[۱۰]) با استفاده از اسپکتروفتومتر است. این روش کمی بوده که براساس میزان چسبندگی کلنی‌های باکتریایی به سطوح پلی استیرن ته چاهک‌ها و رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله و قرائت جذب نوری ۵۷۰ نانومتر آن‌ها با استفاده از دستگاه خوانشگر الایزا[۱۱] (استت فکس، آمریکا[۱۲]) است (۱۷). سویه هایی که جذب نوری[۱۳] آن‌ها زیر ۰/۳۵ بود غیرچسبنده، سویه‌هایی که جذب نوری آن‌ها بین ۰/۳۵ تا ۰/۴۵ بود چسبندهٔ ضعیف و سویه‌هایی که جذب نوری آن‌ها بالاتر از ۰/۴۵ بود به‌عنوان چسبندهٔ قوی در نظر گرفته شدند.

استخراج DNA: جهت استخراج DNA سویه‌های مولد بیوفیلم، از روش جوشاندن استفاده شد (۱۸). برای این منظور، چند کلنی از باکتری در ۲۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی حل شد و به‌خوبی ورتکس شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد. پس از ۱۵ دقیقه سانتریفوژ

با دور ۱۳۰۰۰، ۱۰ میکرولیتر از سوپرناتانت[۱۴] به‌عنوان الگوی DNA در آزمون واکنش زنجیره‌ای آنزیم پلیمراز[۱۵] استفاده شد.

تعیین ژن های مؤثر بر تولید بیوفیلم: جهت تعیین وجود ژن‌های *icaA* و *icaD* از آزمون واکنش زنجیره‌ای آنزیم پلیمراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که آرکیولا و همکاران[۱۶] معرفی کرده‌اند استفاده شد (۱۹). تکثیر این ژن‌ها با مخلوط واکنش زنجیره‌ای آنزیم پلیمراز و چرخهٔ حرارتی که آرکیولا و همکاران معرفی کرده‌اند انجام گرفت. باندهای مدنظر برای ژن‌های *icaA* و *icaD* به‌ترتیب ۱۸۸ و ۱۹۸ جفت باز بودند.

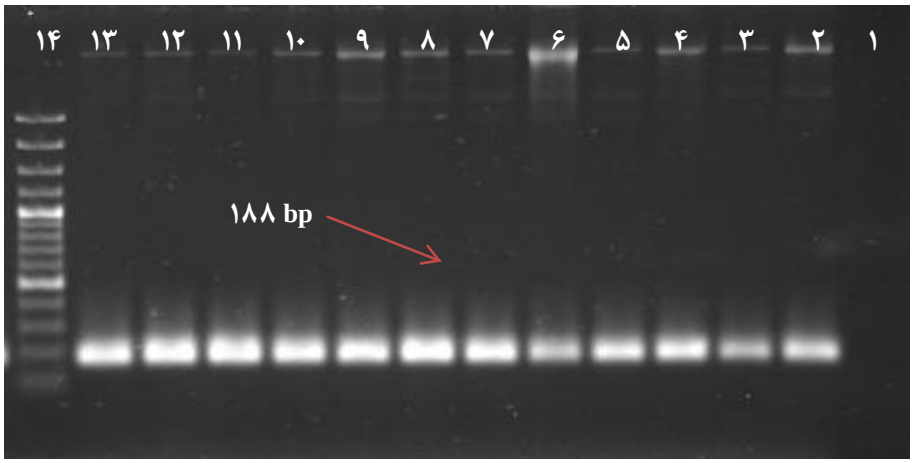
نتایج

جداسازی و شناسایی باکتری‌ها: در این مطالعه ۲۰۰ فرد سالم که متشکل از ۱۰۰ زن و ۱۰۰ مرد سالم بودند انتخاب شدند که درمجموع ۱۰۴ سویهٔ *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* از این افراد جداسازی شد. بدین ترتیب که ۴۹ سویه (۴۷درصد) از مردان و ۵۵ سویه (۵۳درصد) نیز از زنان جداسازی شد. تمامی این سویه‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی و تأیید شدند.

آزمون کیفی تولید بیوفیلم: درمجموع از ۱۰۴ سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* جداسازی‌شده از افراد سالم در این مطالعه، پس از کشت بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو، ۳۹ سویه (۳۸درصد) کلنی‌های سیاه‌رنگ (بیوفیلم مثبت)، ۲۷ سویه (۲۶درصد) کلنی‌های قرمزرنگ (نامشخص) و ۳۸ سویه (۳۶درصد) نیز کلنی‌های قرمزِ روشن (بیوفیلم منفی) تشکیل دادند.

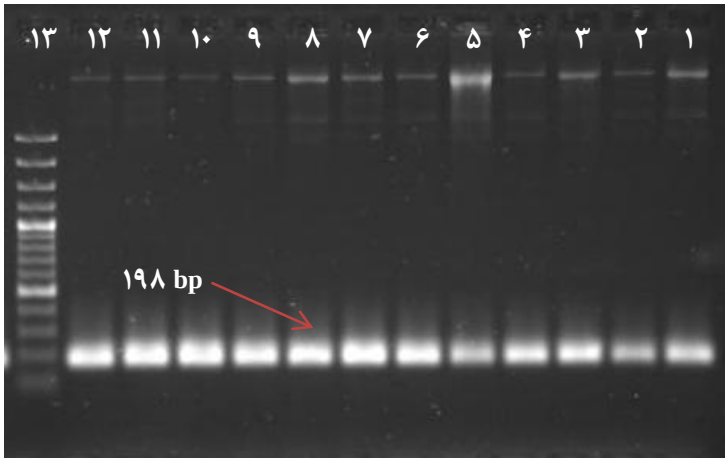
آزمون کمی تولید بیوفیلم: پس از انجام آزمون میکروتیتر پلیت جهت سنجش کمی تولید بیوفیلم، مشخص شد که در این بررسی ۴۹ سویه (۴۷درصد) به عنوان سویه های چسبنده، ۱۷ سویه (۱۶درصد) به‌عنوان سویه‌های چسبندهٔ ضعیف و ۳۸ سویه (۳۷درصد) نیز به عنوان سویه‌های غیرچسبنده تعیین شدند.

تعیین ژن‌های *icaA* و *icaD*: پس از انجام آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت شناسایی *icaA* و *icaD* مشخص شد که ۱۰۰درصد سویه‌ها (۶۶ سویه) دارای هر دو ژن بودند (شکل‌های ۱ و ۲). در این مطالعه نتایج آزمون‌های فنوتایپی و ژنوتایپی کاملاً منطبق بر یکدیگر بودند.



شکل ۱- آزمون واکنش زنجیره‌ای آنزیم پلیمراز جهت شناسایی ژن *icaA* در میان سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس*

چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک‌های ۱۲-۲ سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس*، چاهک ۱۳: کنترل مثبت، چاهک ۱۴: بیانگر DNA.



شکل ۲- آزمون واکنش زنجیره‌ای آنزیم پلیمراز جهت شناسایی ژن *icaD* در میان سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس*
چاهک ۱: کنترل مثبت، چاهک‌های ۱۲-۲: سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس*، چاهک ۱۳: بیانگر DNA.

بحث و نتیجه‌گیری

در مقایسه با *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* عوامل حدت کمتری دارد و توانایی میکروارگانیسم در چسبیدن و تولید بیوفیلم بر روی سطوح وسایل خارجی مهم‌ترین عامل مؤثر در بیماری‌زایی این باکتری به شمار می‌رود. مقاومت آنتی‌بیوتیکی فزاینده نسبت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها در میان سویه‌های مولد بیوفیلم در محیط‌های بیمارستانی، نگرانی‌های زیادی را در رابطه با کنترل و انتقال این مقاومت به سایر سویه‌های بیمارستانی به وجود آورده است (۲۰).

توانایی تولید بیوفیلم با استفاده از آزمون‌های فنوتایپی مختلفی بررسی می‌شود؛ آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو نشان داد که ۳۹ سویه (۳۸درصد) کلنی‌های سیاه‌رنگ (بیوفیلم مثبت)، ۲۷ سویه (۲۶درصد) کلنی‌های قرمزرنگ (نامشخص) و ۳۸ سویه (۳۶درصد) را نیز کلنی‌های قرمزِ روشن (بیوفیلم منفی) تشکیل دادند. در ایران در مطالعه‌ای که بر افراد سالم و بیمار به انجام رسیده است، ۱۰درصد سویه‌های جداسازی‌شده از افراد سالم و ۸۶درصد سویه‌های جداسازی‌شده از افراد بیمار توانایی تشکیل بیوفیلم داشتند (۲۱). در آلمان نیز محققان ۵۲ سویه از کشت خون بیماران و ۳۶ سویه از پوست افراد سالم داوطلب را جداسازی و بررسی کردند. در آن مطالعه، ۸۷درصد سویه‌های جداسازی شده از کشت خون، تولیدکنندهٔ بیوفیلم بودند درحالی‌که تنها ۶درصد از سویه‌های ساپروفیت جداسازی‌شده از افراد سالم توانایی تولید بیوفیلم داشتند (۲۲). همچنین مطالعهٔ محققان ایتالیایی نشان داد که ۴۸/۵درصد از سویه‌های بالینی قادر به تولید بیوفیلم بودند، درحالی‌که هیچ‌کدام از سویه‌هایی که از افراد داوطلب سالم جداسازی شدند بیوفیلم تولید نمی‌کردند (۲۳). در بررسی تولید بیوفیلم در سویه‌های جداسازی شده از وسایل پزشکی درون بدن بیماران در سال ۲۰۰۲، در میان ۱۱۳ سویهٔ جداسازی‌شده، ۵۷/۵درصد سویه‌ها بیوفیلم مثبت بودند (۲۴).

نتایج بررسی کمی تولید بیوفیلم در این مطالعه نشان داد که ۴۹ سویه (۴۷درصد) به‌عنوان سویه‌های چسبنده، ۱۷ سویه (۱۶درصد) به‌عنوان سویه‌های چسبندهٔ ضعیف

و ۳۸ سویه (۳۷درصد) نیز به‌عنوان سویه‌های غیرچسبنده تعیین شدند. در ایران، ۶۸درصد از سویه‌های بیمارستانی دارای قدرت چسبندگی قوی به سطوح پلی‌استیرن میکروپلیت بودند، درحالی‌که در سویه‌های جداشده از افراد سالم، تنها ۱۵درصد سویه‌ها قدرت چسبندگی قوی داشتند (۲۱). در ایرلند، تولید بیوفیلم در میان سویه‌های بیمارستانی ۷۱/۴درصد و در میان سویه‌های افراد سالم ۸۴/۶درصد بود (۲۵). در آلمان مشخص شد که ۸۷درصد سویه‌های جداسازی‌شده از کشت خون، ۴۷درصد سویه‌های جداسازی‌شده از عفونت‌های ادراری و ۷درصد از سویه‌های فلور طبیعی افراد سالم توانایی تولید بیوفیلم داشتند (۲۶). در آمریکا نیز سویه‌هایی که از بیماران بستری مبتلا به سپتی‌سمی ناشی از استفاده از سوند جداسازی شده‌اند، چسبندگی بیشتری نسبت به سویه‌های آلوده‌کنندهٔ کشت خون و سویه‌های جداشده از پوست افراد سالم دارند (۲۷). همچنین در مطالعهٔ دیگری در آمریکا مشخص شد که در آزمون کمی تولید بیوفیلم، ۸۷درصد سویه‌های جداسازی‌شده از کشت خون توانایی چسبندگی به سطوح پلی استیرن را داشتند که این میزان در نمونه های جداسازی‌شده از افراد سالم ۱۱درصد بوده است (۲۲). براساس تعاریف ارائه شده، افراد سالم در طی ۶ ماه منتهی به زمان نمونه گیری هیچ‌گونه تماسی با سویه‌های بیمارستانی نداشته‌اند و این معیار، اصلی‌ترین شاخص غربال‌گری افراد در این مطالعه بوده است؛ بنابراین این سویه‌ها، فلور گذرا نیستند و مربوط به فلور ساکن و مقیم خود افراد هستند. با توجه به نتایج مطالعات حاصل از نقاط مختلف جهان این‌گونه به نظر می‌رسد که توانایی تولید بیوفیلم در میان سویه های جداسازی‌شده از افراد سالم بسیار پایین‌تر از مطالعهٔ حاضر است که نشان‌دهندهٔ کلونیزه‌شدن افراد سالم با سویه های بیمارستانی مولد بیوفیلم در ایران است؛ بنابراین، این‌گونه به نظر می‌رسد که سویه‌های بیمارستانی در جامعهٔ شهری ایران شیوع زیادی دارند.

در مطالعهٔ حاضر دو ژن *icaA* و *icaD* بررسی شدند و ۱۰۰درصد سویه‌های مولد بیوفیلم دارای این ۲ ژن بودند. در مطالعه‌ای در ایران در سال ۲۰۰۹، وجود اپرون *ica* در ۳۰درصد از سویه‌های بیمارستانی و ۸درصد از سویه‌های جداسازی‌شده از افراد سالم گزارش شد (۲۸). در فرانسه، شیوع بیشتر ژن *ica* در سویه‌های بیماری‌زا در مقایسه با سویه‌های آلوده‌کنندهٔ کشت خون بیماران نشان داده شد (۲۹). در ایتالیا، ۴۹درصد از سویه‌های جداسازی‌شده از سوند دارای هر دو ژن *icaA* و *icaD* بودند، درحالی‌که هیچ‌کدام از سویه‌های جداسازی‌شده از افراد سالم دارای این دو ژن نبودند (۳۰). در سال ۲۰۰۰ در سوئد، ۸۱/۵درصد سویه‌های جداسازی‌شده از بیماران دارای اپرون *ica* بودند، اما در ۱۷/۴درصد از سویه‌های جداشده از افراد سالم، این اپرون شناسایی شد (۲۵). در ایتالیا، ۶۷ سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* جداسازی‌شده از بیماران بستری در بیمارستان که مبتلا به عفونت مرتبط با سوند بودند، ۷۰درصد سویه‌ها دارای هر دو ژن *icaA* و *icaD* بودند (۳۰). در بررسی‌های صورت‌گرفته بر سویه‌های جداسازی‌شده از آلودگی‌های مفاصل مصنوعی، نشان داده شد که بیش از نیمی از این سویه‌ها دارای اپرون *ica* بودند، درحالی‌که از ۲۴ سویه ساپروفیت ساکن سطح پوست افراد سالم، تنها ۳۰درصد سویه‌ها، دارای این اپرون بودند (۳۰). پیش‌تر نشان داده شده است که حضور اپرون *icaADBC* به‌تنهایی نمی‌تواند بیانگر تولید بیوفیلم باشد و عوامل دیگری از جمله شرایط کشت (وجود قند گلوکز) نیز در تولید بیوفیلم مؤثر است (۲۸). همان‌گونه

که پیش‌تر اشاره شد، به نظر می‌رسد که این سویه‌ها بیمارستانی هستند و بنابراین بیشتربودن میزان شیوع سویه‌های *icaA* و *icaD* در این مطالعه می‌تواند ناشی از منشأ بیمارستانی و قدرت زیاد تولید بیوفیلم در این سویه‌ها باشد.

در این مطالعه، بررسی بیوفیلم به روش‌های فنوتایپی و ژنوتایپی ارزیابی شد؛ اما ازآنجاکه تولید بیوفیلم و عفونت‌زایی این سویه ها، چندعاملی است و تحت کنترل عوامل مختلف ژنتیکی قرار دارد، نیازمند بررسی کامل ژن های درگیر در فرآیند تشکیل بیوفیلم است. شیوع بالای سویه های *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* مولد بیوفیلم در افراد سالم، هشدار و خطری جدی برای سلامت جامعه است. ورود این باکتری‌ها به سیستم ادراری-تناسلی به یک مشکل اساسی مبدل خواهد شد که عملاً ازبین‌بردن و ریشه‌کنی آن‌ها را بسیار مشکل می‌کند. انجام چنین مطالعه‌ای در سطح گسترده در کشور جهت غربال گری و دسترسی به اطلاعات کامل افراد سالم کاملاً ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه اصفهان، شماره ۹۲۰۴۱۱، به انجام رسیده است.

References

(1) Pfaller MA., Herwaldt LA. Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews* 1988; 1 (3): 281- 99.

(2) Liakopoulos V., Petinaki E., Efthimiadi G., Klapsa D., Giannopoulou M., Dovas S., et al. Clonal relatedness of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the haemodialysis unit of a single university centre in Greece. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2008; 23 (8): 2599- 603.

(3) Piette A., Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Veterinary Microbiology* 2009; 134 (1): 45- 54.

(4) Secchi C., Antunes ALS., Perez LRR., Cantarelli VV., d'Azevedo PA. Identification and detection of methicillin resistance in non-epidermidis coagulase-negative staphylococci. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2008; 12 (4): 316- 20.

(5) Heikens E., Fleer A., Paauw A., Florijn A., Fluit A. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43 (5): 2286- 90.

(6) Marsou R., Bes M., Brun Y., Boudouma M., Idrissi L., Meugnier H., et al. Molecular techniques open up new vistas for typing of coagulase- negative *staphylococci*. *Pathologie Biologie* 2001; 49 (3): 205- 15.

(7) von Eiff C., Peters G., Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase negative staphylococci. *The Lancet Infectious Diseases* 2002; 2 (11): 677- 85.

(8) Petrelli D., Repetto A., D'Ercole S., Rombini S., Ripa S., Prenna M., et al. Analysis of meticillin-susceptible and meticillin-resistant biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from catheter infections isolated in a large Italian hospital. *Journal of Medical Microbiology* 2008; 57 (3): 364- 72.

(9) Gad GFM., El-Feky MA., El-Rehewy MS., Hassan MA., Abolella H., El-Baky RMA. Detection of *icaA, icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *The Journal of Infection in Developing Countries* 2009; 3 (5): 342- 51.

(10) Miller PJ., Farland AM., Knovich MA., Batt KM., Owen J. Successful treatment of intravenously abused oral Opana ERinduced thrombotic microangiopathy without plasma exchange. *American Journal of Hematology* 2014; 89 (7): 695- 7.

(11) Gould I. Costs of hospital- acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and its control. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2006; 28 (5): 379- 84.

(12) Olson ME., Slater SR., Rupp ME., Fey PD. Rifampicin enhances activity of daptomycin and vancomycin against both a polysaccharide intercellular adhesin (PIA)-dependent and-independent *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010; 65 (10): 2164- 71.

(13) Biswas R., Voggu L., Simon UK., Hentschel P., Thumm G., Götz F. Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiology Letters* 2006; 259 (2): 260- 8.

(14) MacFadin JF. *Biochemmical Tests for Identification of Medical Bacteria*: 3rd ed. Philadelphia, Lippincott: Willialms and Wilkins; 2000.

(15) Winn WC., Koneman EW. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*: 6th ed. Philadelphia, Lippincott: Williams & Wilkins; 2006.

(16) Knobloch JK-M., Horstkotte MA., Rohde H., Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology* 2002; 191 (2): 101- 6.

(17) Peeters E., Nelis HJ., Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods* 2008; 72 (2): 157-65.

(18) Rahimi F., Bouzari M., Maleki Z., Rahimi F. Antibiotic susceptibility pattern among *Staphylococcus* spp. with emphasis on detection of *mecA* gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases* 2009; 4 (3): 143- 50.

(19) Arciola CR., Campoccia D., Gamberini S., Donati ME., Baldassarri L., Montanaro L. Occurrence of ica genes for slime synthesis in a collection of *Staphylococcus epidermidis* strains from orthopedic prosthesis infections. *Acta Orthopaedica* 2003; 74 (5): 617- 21.

(20) Longauerova A. Coagulase negative staphylococci and their participation in pathogenesis of human infections. *Bratislavske lekarske listy* 2006; 107 (11/12): 448.

(21) Vatankhah H., Shafiei M., Saifi M., Pourshafie MR., Talebi M., Shahbazzadeh D. Phenotyping of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from hospitalized patients compare with strains isolated from health people. *Journal of Infectious Disease and Tropical Medicine* 2009; 50: 33- 8.

(22) Ziebuhr W., Heilmann C., Götz F., Meyer P., Wilms K., Straube E., et al. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infection and Immunity* 1997; 65 (3): 890- 6.

(23) Arciola CR., Baldassarri L., Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39 (6): 2151- 6.

(24) Arciola CR., Campoccia D., Gamberini S., Cervellati M., Donati E., Montanaro L. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus. *Biomaterials* 2002; 23 (21): 4233-9.

(25) Galdbart J-O., Allignet J., Tung H-S., Rydèn C., El Solh N. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and Those responsible for infections of joint prostheses. *Journal of Infectious Diseases* 2000; 182 (1): 351- 5.

(26) Kozitskaya S., Cho S-H., Dietrich K., Marre R., Naber K., Ziebuhr W. The bacterial insertion sequence element IS*256* occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infection and Immunity* 2004; 72 (2): 1210- 5.

(27) Christensen GD., Simpson W., Younger J., Baddour L., Barrett F., Melton D., et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology* 1985; 22 (6): 996- 1006.

(28) Eftekhar F., Mirmohamadi Z. Evaluation of biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates from nosocomial infections and skin of healthy volunteers. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* 2009; 1 (10): 438- 41.

(29) Frebourg NB., Lefebvre S., Baert S., Lemeland J-F. PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38 (2): 877- 80.

(30) Petrelli D., Zampaloni C., D'Ercole S., Prenna M., Ballarini P., Ripa S., et al. Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2006; 25 (12): 773- 81.

---

[1]- Coagulase Negative Staphylococci
[2]- Polysaccharide Intercellular Adhesion
[3]- Thioglycollate broth
[4]- Merck, Germany
[5]- Mannitol Salt Agar
[6]- DNase
[7]- PYR
[8]- Congo Red agar
[9]- Trypticase Soy broth
[10]- Greiner, Louis, USA
[11]- ELISA reader
[12]- Stat fax, USA
[13]- Optical density (OD)
[14]- Supernatant
[15]- Polymerase Chain Reaction (PCR)
[16]- Arciola *et al.*

Biofilm production among *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from healthy people

Fateh Rahimi *
Assistant Professor of Bacteriology, University of Isfahan, Iran, f.rahimi@sci.ui.sc.ir
Mohammad Reza Arabestani
Assistant Professor of Bacteriology, Hamadan University of Medical Sciences, Iran, mohammad.arabestani@gmail.com

Abstract

Introduction: *Staphylococcus epidermidis* is well documented as a nosocomial pathogen causing biofilm in patients and healthy people. The aim of this study was to analyze the biofilm formation of *S. epidermidis* strains isolated from healthy people during 2013-2014.

Materials and methods: Totally 200 healthy people were selected and the sampling was carried out from arm, armpit and axillary area using sterile swaps. Swaps were transferred to thiogylcollate broth and then cultured on mannitol salt agar plates. Isolates were identified at the species level using biochemical tests. Potential of biofilm formation of strains was measured using congo red agar plate and microtiter plate tests. Genes involved in biofilm formation, *icaA* and *icaD*, were detected using PCR.

Results: Totally 104 *S. epidermidis* strains were isolated from healthy people. Amongst these, 66 (63%) and 38 (37%) strains were positive and negative for biofilm formation, respectively. *icaA* and *icaD* genes were detected in 100% of strains.

Discussion and conclusion: Prevalence of biofilm producing S. *epidermidis* isolates among healthy people indicating their colonization with hospital strains. Prevalence of such strains is urgent for public health.

Key words: *S. epidermidis*, biofilm, healthy people

* Corresponding author
Received: November 24, 2014 / **Accepted:** July 4, 2015