Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 38, No. 6, Feb. – Mar. 2017, Pages: 34-41

Original Article

Detection of Some Virulence Factors in *Staphylococcus aureus* Isolated from Shahid Beheshti Hospital of Hamedan in the Years 2014-2015

Aram Sharifi[1], Abdolmajid Mohammadzadeh[1*], Taghi Zahraei Salehi[2], Pezhman Mahmoodi Koohi[1]

[1]Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
[2]Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 6 May, 2016 Accepted: 17 Aug, 2016

Abstract

Background & Objectives: *Staphylococcus aureus* is one of the most important nosocomial pathogens. Pathogenicity of this organism is attributed to various virulence factors such as surface adhesion proteins, the ability to produce toxins and enzymes, rapid development of drug resistance and biofilm formation. The present study was conducted to investigate some of the virulence factors of *S. aureus* isolates.

Materials & Methods: A total of 30 isolates of *S. aureus* were collected from clinical samples of patients hospitalized in Shahid Beheshti hospital of Hamedan. Identification of bacteria was done using biochemical (catalase, coagulase and DNase) and molecular (PCR) tests. Thereafter, antibiotic susceptibility of the isolates and their ability to produce hemolysin, beta-lactamase and biofilm were assessed using disk diffusion, blood agar medium, acidimetric and microtiter-plate tests, respectively.

Results: Hemolysis activities of the isolates on sheep blood agar showed that 8 (26.66%), 14 (46.66%) and 15 (50%) out of 30 isolates, produced α-, ∂- and β-hemolysins, respectively. While, using human blood agar media, the prevalence of these toxins were 40%, 53.33% and 13.33%, respectively. Twenty one isolates (70%) were found to be beta-lactamase producer using the acidimetric test. Meanwhile, the results of antibiotic susceptibility test indicated that penicillin was the less effective antibiotic (90% resistance). However, none of the isolates was resistant to vancomycin. Moreover, regarding to biofilm formation, 14 (46.66%) isolates strongly produced biofilms.

Conclusions: The results of this study revealed high frequencies of the virulence factors among the examined *S. aureus* isolates, specially the ability of biofilm formation and antibiotic resistance.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Virulence Factors, Biofilm, Hemolysin

***Corresponding author:**
E-mail: mohammadzadeh4@gmail.com

Citation: Sharifi A, Mohammadzadeh A, Zahraei Salehi T, Mahmoodi P. Detection of Some Virulence Factors in *Staphylococcus aureus* Isolated from Shahid Beheshti Hospital of Hamedan in the Years 2014-2015. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2017;38(6):34-41.

مقاله پژوهشی

تعیین برخی از فاکتورهای حدت در *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از بیمارستان شهید بهشتی شهر همدان در سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۳

آرام شریفی[۱]، عبدالمجید محمدزاده[۱*]، تقی زهرائی صالحی[۲]، پژمان محمودی کوهی[۱]

[۱]گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران

[۲]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

دریافت: ۹۵/۲/۱۷ پذیرش: ۹۵/۵/۲۷

چکیده

زمینه و اهداف: استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین عوامل بیماریزای عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شود. بیماری‌زایی این ارگانیسم وابسته به فاکتورهای حدت مختلفی مانند پروتئین‌های چسبنده سطحی، توانایی تولید توکسین‌ها و آنزیم‌ها، ایجاد مقاومت دارویی سریع و تشکیل بیوفیلم می‌باشد. مطالعه حاضر به منظور بررسی برخی از فاکتورهای حدت جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در مجموع ۳۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های بالینی بیماران بستری شده در بیمارستان شهید بهشتی شهر همدان جمع‌آوری شد. شناسایی جدایه‌ها با کمک آزمون‌های بیوشیمیایی (کاتالاز، کواگولاز و DNase) و مولکولی (PCR) صورت گرفت. سپس حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها و توانایی آنها در تولید همولیزین، بتالاکتاماز و بیوفیلم به ترتیب با استفاده از آزمون‌های انتشار دیسک، آگار خوندار، اسیدومتری و میکروتیتر- پلیت بررسی شدند.

یافته‌ها: فعالیت همولیزی جدایه‌ها بر روی آگار خوندار گوسفندی نشان داد که از مجموع ۳۰ جدایه، ۸ (۲۶/۶۶٪)، ۱۴ جدایه (۴۶/۶۶٪) و ۱۵ جدایه (۵۰٪) به ترتیب همولیزین‌های آلفا، دلتا و بتا را تولید کردند. در حالی که با استفاده از محیط‌های آگار خوندار انسانی، فراوانی تولید این توکسین‌ها به ترتیب ۴۰٪، ۵۳/۳۳٪ و ۱۳/۳۳٪ بود. با استفاده از تست اسیدومتری مشخص شد که ۲۱ جدایه (۷۰٪) قادر به تولید بتالاکتاماز بودند. بعلاوه، آزمون حساسیت آنتی-بیوتیکی نشان داد که پنی‌سیلین کم اثرترین آنتی بیوتیک بود (۹۰٪ مقاومت). هرچند هیچ یک از جدایه‌ها به ونکومایسین مقاوم نبودند. در مورد تشکیل بیوفیلم نیز، ۱۴ جدایه (۴۶/۶۶٪) به طور قوی بیوفیلم تولید کردند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه حاکی از فراوانی بالای فاکتورهای حدت به خصوص توانایی تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شده بود.

کلید واژه‌ها: *استافیلوکوکوس اورئوس*، فاکتورهای حدت، بیوفیلم، همولیزین

* ایمیل نویسنده رابط: mohammadzadeh4@gmail.com

مقدمه

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. این باکتری فرصت طلب، عامل طیف وسیعی از بیماری‌های عفونی می‌باشد که از آن جمله می‌توان به عفونت پوست و تشکیل آبسه، عفونت بافت‌های استخوانی، اندوکاردیت، پنومونی، عفونت اعضای مصنوعی و... نام برد. بیماری‌زایی این باکتری یا به صورت تهاجم بافتی و یا تولید و ترشح فاکتورهای خارج سلولی اتفاق می‌افتد (۱). اهمیت بالینی این باکتری جهت بیماری‌زایی وابسته به فاکتورهای حدت مختلف، پروتئین‌های سطحی، توکسین‌ها، آنزیم‌ها و همچنین توانایی ایجاد مقاومت سریع علیه آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌باشد (۲). از جمله توکسین‌های مهم ترشحی توسط این باکتری شامل همولیزین‌ها (آلفا، بتا، دلتا و گاما)، لکوسیدین‌ها، انتروتوکسین‌های مقاوم به حرارت

(Heat-stable staphylococcal enterotoxins (SEs) ، اکسفولیاتیو توکسین، توکسین شوک توکسیک ۱ (TSST1) می‌باشد (۴،۳). جهت درمان عفونت‌های استافیلوکوکی از آنتی بیوتیک‌هایی مانند سفالکسین و کلوگزاسیلین استفاده می‌شود (۵). اما امروزه گزارشات فراوانی از ظهور سویه‌های مقاوم این باکتری به چند آنتی‌بیوتیک دیده می‌شود و این مقاومت دارویی در مورد این باکتری به مسئله بسیار مهمی در زمینه درمان عفونت های باکتریایی تبدیل شده است. به عنوان مثال سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) از این جمله هستند (۶). یکی دیگر از فاکتورهای مهم دیگر جهت بیماری‌زایی این باکتری توانایی تشکیل بیوفیلم است. بیوفیلم یک ساختار مقاوم چند لایه‌ای باکتریایی است که درون یک پلیمر خارج سلولی محصور است. باکتری در این حالت به شدت به مواد باکتری‌کش مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر ترکیبات شیمیایی مقاوم می‌شود (۷). به دلیل طیف گسترده بیماری‌های ایجاد شده توسط حالت بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس مانند اندوکاردیت، استئومیلیت، آرتریت، عفونت زخم و عفونت کاتترها و سوندها توانایی تشکیل بیوفیلم سویه‌های مختلف این باکتری بسیار حائز اهمیت هستند و امروزه بیوفیلم این باکتری بصورت گسترده مورد مطالعه قرار می‌گیرد (۸). هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی فاکتورهای حدت جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس اخذ شده از بیمارستان بعثت شهر همدان می‌باشد. در مطالعه حاضر سه نوع همولیزین این باکتری (آلفا، بتا و دلتا)، الگوی مقاومت آنتی-بیوتیکی، توانایی تولید بتالاکتاماز و توانایی تشکیل بیوفیلم این جدایه‌ها تعیین شد.

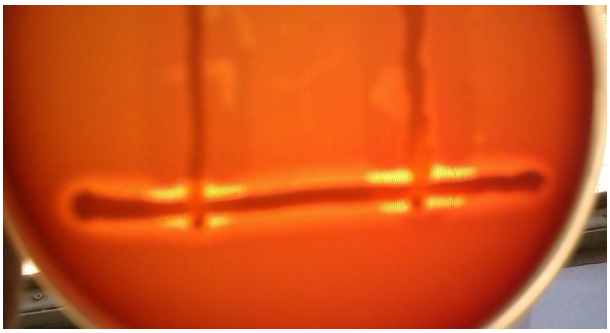
مواد و روش‌ها

سویه های باکتری

در مطالعه حاضر در مجموع ۳۰ جدایه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌های باکتری از بیماران بستری شده در بخش‌های مختلف بیمارستان شهید بهشتی شهر همدان از فروردین ۱۳۹۳ تا مهر۱۳۹۴ اخذ گردید. جهت شناسایی و تایید باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از تست‌های رنگ آمیزی گرم (مثبت)، کاتالاز (مثبت)، اکسیداز (منفی) و کواگولاز اسلایدی (مثبت) و همچنین محیط‌های افتراقی از جمله محیط آگار خوندار، مانیتول سالت آگار (MSA) و DNase Agar استفاده شد (۹). جدایه مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس با تست‌های فنوتیپی، به وسیله تعیین حضور ژن femA با تکنیک PCR تایید شدند (۱۰). جدایه‌های تایید شده جهت ذخیره‌سازی در محیط TSB کشت داده شدند. سپس از محیط کشت TSB حاوی باکتری با گلیسرول استریل به نسبت ۷۰ به ۳۰ (حجمی- حجمی) مخلوط شده و در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. سویه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی جهت تست-های انجام شده از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران (PTCC) تهیه گردید.

سنجش توانایی تولید همولیزین‌ها

بررسی همولیزین‌ها طبق آنچه Hebert و همکاران گزارش کردند، انجام گرفت (۱۱). پدیده همولیز روی محیط کشت تریپتیک سوی آگار (TSA) حاوی ۵ درصد خون فاقد فیبرین تازه گوسفندی و به دنبال انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. بر همین اساس هاله کاملا شفاف همولیز در اطراف کلنی ناشی از همولیزین آلفا و هاله همولیز ناقص (نیمه شفاف) که پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون مجدد در دمای ۴ درجه سانتی گراد کامل می شود، ناشی از همولیزین بتا در نظر گرفته شد. جهت تعیین توانایی تولید دلتا همولیزین، از پدیده سینرژیسمی همولیز سویه دلتا همولیزین مثبت با یک سویه بتا همولیزین مثبت استفاده شد. به این صورت که بر روی محیط کشت بلاد آگار یک خط افقی از باکتری استافیلوکوکوس اینترمدیوس دارای همولیزین بتا کشت داده می‌شود. سپس جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به صورت عمود بر خط کشت قبلی کشت داده می‌شوند. پس از انکوباسیون ۱۸ تا ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کامل شدن همولیزین بتای استافیلوکوکوس اینترمدیوس در محل تلاقی با خط کشت نمونه استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان دلتا همولیزین مثبت گزارش می‌شود. (مطابق شکل ۱).



شکل ۱: بررسی توانایی تولید همولیزین دلتا

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش آگار دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) روی محیط مولر هینتون آگار (Merck, Germany) طبق دستورالعمل انستیتوی استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)) انجام شد (۱۲). آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی شامل پنی‌سیلین، اکسی-تتراسایکلین، آزیترومایسین، فورازولیدون، کلیندامایسین، ونکومایسین و متی‌سیلین بودند. برای انجام آزمایش ابتدا تک کلنی خالص رشد یافته روی محیط TSA به محیط کشت TSB منتقل شده و پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته، با PBS استریل کدورت محیط کشت معادل نیم مکفارلند شد. سپس از این رقت، با سواپ استریل به صورت چمنی روی محیط مولر هینتون آگار کشت انجام شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی با فاصله روی محیط

قرار داده شدند. پلیت‌های محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر گزارش گردید. سپس مطابق جدول گزارش شده توسط CLSI برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، جدایه‌ها بر حسب هر کدام از آنتی بیوتیک‌های بررسی شده، به سه گروه حساس، نیمه حساس و مقاوم تقسیم‌بندی شدند.

بررسی توانایی تولید بتالاکتاماز

تعیین توانایی تولید آنزیم بتالاکتاماز با تست اسیدومتری مطابق پروتوکل Sng و همکاران با کمی تغییرات انجام شد (۱۳). ابتدا محلول پنی‌سیلین آماده شد. محلول پنی‌سیلین شامل ۵ درصد پنی-سیلین G کریستاله، ۰/۲ درصد بروموکرزول سبز در فسفات بافر ۰/۰۵ مولار، pH: 8.0 (در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) تهیه گردید. محلول پنی‌سیلین آماده شده در ویال‌های کوچک تقسیم شده و تا زمان آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. جهت انجام آزمایش یک تیکه کاغذ صافی به اندازه ۵×۲ سانتی‌متر در یک پتریدیش قرار داده شد و سپس مقداری از محلول پنی‌سیلین به کاغذ صافی تلقیح گردید (به طوری که سطح کاغذ را بگیرد). به وسیله لوپ باکتریولوژیک مقداری از کلنی ۲۴ ساعته باکتری رشد کرده روی محیط TSA روی کاغذ صافی قرار تلقیح گردید. سپس درب پتریدیش گذاشته شده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. رؤیت هاله سفید اطراف کلنی تلقیح شده، به عنوان توانایی تولید آنزیم پنی‌سیلیناز گزارش شد.

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم

سنجش توانایی تولید بیوفیلم با روش میکروتیتر پلیت (Microtiter plate assay) مطابق دستورالعمل گزارش شده توسط Atshan و همکاران با کمی تغییرات انجام شد (۱۴). ابتدا جدایه‌ها در محیط کشت TSB حاوی یک درصد گلوکز کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باکتری رشد کرده به نسبت ۱ به ۲۰۰ در محیط جدید TSBحاوی یک درصد گلوکز رقیق شده و از این محیط میزان ۲۰۰ میکرولیتر در گوده‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف تلقیح شد. پس از گرمخانه‌گذاری میکروپلیت‌ها، با برگرداندن آن‌ها سلول‌های باکتریایی چسبیده نشده خارج شدند. پس از خالی کردن محتویات گوده، میکروپلیت‌ها سه مرتبه با آب دی یونیزه شسته شدند. میکروپلیت‌ها به مدت سه ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند و سپس به گوده‌ها ۱۰۰ میکرولیتر سافرانین ۰/۱ درصد اضافه گردید. جهت رنگ شدن باکتری‌های چسبیده میکروپلیت‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند. سپس رنگ سافرانین خارج شد و محتویات گوده ها دو مرتبه با آب مقطر دی یونیزه شسته شدند. نهایتا ۱۰۰ میکرولیتر محلول اتانول- اسید استیک (۹۵ به ۵ حجمی/حجمی) اضافه شد و با دستگاه الایزا ریدر (ELx800) جذب نوری گوده‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر تعیین شد. بر اساس میزان جذب نوری، Cut-off بر حسب کنترل منفی گرفته شد (۱۴). با استناد به مطالعه Snel و همکاران از باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ATCC 12228 به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱۵). مطابق جدول ۱ جدایه‌ها به سه گروه قوی، متوسط و ضعیف یا منفی تقسیم شدند.

جدول ۱: طبقه‌بندی توانایی تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت

توانایی تشکیل بیوفیلم	محاسبه میزان Cut-off	میانگین جذب نوری (OD)
قوی	<OD ۴ ✻ODc×	< OD۲/۰۸۰
متوسط	ODc < ۴ ODc××۲ ≤ OD	≥ OD ۲/۰۸۰>۱/۰۴۰
ضعیف یا منفی	≥ OD ۲ ODc×	≥ OD ۱/۰۴۰

✻ODc = Mean of OD values of negative controls + (3×SD of OD values of negative controls)

آنالیز آماری

جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS ver.19 استفاده شد. میزان همبستگی بین تشکیل بیوفیلم و تولید دلتا همولیزین با تست اسپیرمن تعیین گردید.

یافته‌ها

توانایی تولید انواع همولیزین‌ها روی خون گوسفند و انسان در جدول ۲ نشان داده شده است. در بلاد آگار گوسفندی ۸ جدایه (۲۶/۶۶ درصد) آلفا همولیزین مثبت بودند؛ همچنین ۱۵ جدایه (۵۰٪) دلتا همولیزین مثبت و ۱۴ جدایه (۴۶/۶۶٪) بتا همولیزین مثبت گزارش شدند. در بلاد آگار خون انسانی ۱۲ جدایه (۴۰٪) آلفا همولیزین مثبت، ۱۶ جدایه (۵۳/۳۳٪) دلتا همولیزین مثبت و ۴ جدایه (۱۳/۳۳٪) بتا همولیزین مثبت بودند. در تست بتالاکتاماز به روش اسیدومتری ۲۱ جدایه (۷۰٪) مثبت بودند. نتایج حاصل از این تست در جدول ۲ نشان داده شده است. در تست میکروتیتر پلیت بیوفیلم ۱۴ جدایه (۴۶/۶۶٪) در گروه "قوی" قرار گرفت؛ همچنین ۱۵ جدایه (۵۰٪) در گروه "متوسط " و یک جدایه (۳/۳۳٪) در گروه "ضعیف یا منفی" قرار گرفتند. (جدول ۲). نتایج مربوط به بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است. در بین آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده بیشترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (با ۹۰٪ مقاومت) می-باشد. از طرف مقابل همه‌ی ۳۰ جدایه بررسی شده نسبت به آنتی-بیوتیک وانکومایسین حساس بودند. به دنبال وانکومایسین بیشترین حساسیت مربوط به کلیندامایسین (با ۶۶/۶۶٪ حساسیت) بود.

جدول ۲: تولید همولیزین، بتالاکتاماز و تشکیل بیوفیلم جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

بیوفیلم (میانگین جذب در ۴۹۰ نانومتر)	بتالاکتاماز	همولیزین‌ها						جدایه
		بلاد آگار خون انسان (۵ ٪)			بلاد آگار خون گوسفند (۵٪)			
		بتا	دلتا	آلفا	بتا	دلتا	آلفا	
۱۸۴/۲ ± ۰۳۶/۰ (قوی)	مثبت	−	+	+	+	+	−	۱
۵۹۰/۱ ± ۰۰۷/۰ (متوسط)	مثبت	−	+	−	+	+	−	۲
۸۲۲/۲ ± ۰۵۶/۰ (قوی)	مثبت	−	−	+	+	−	+	۳
۹۰۹/۲ ± ۰۴۸/۰ (قوی)	مثبت	+	+	+	+	+	+	۴
۹۶۳/۱ ± ۰۹۸/۰ (متوسط)	منفی	−	−	−	−	−	−	۵
۱۴۷/۲ ± ۰۴۹/۰ (قوی)	مثبت	−	−	−	−	−	−	۶
۹۳۰/۱ ± ۰۶۷/۰ (متوسط)	مثبت	−	+	−	−	+	−	۷
۳۸۳/۲ ± ۰۳۶/۰ (قوی)	مثبت	−	+	−	+	+	−	۸
۲۲۷/۲ ± ۰۳۶/۰ (قوی)	مثبت	−	+	−	+	+	−	۹
۰۸۰/۲ ± ۰۶۷/۰ (قوی)	مثبت	−	+	−	+	+	−	۱۰
۰۶۷/۲ ± ۰۷۶/۰ (متوسط)	مثبت	−	+	+	+	+	−	۱۱
۰۳۸/۲ ± ۰۵۷/۰ (متوسط)	مثبت	−	−	+	−	−	+	۱۲
۱۹۰/۲ ± ۰۲۰/۰ (متوسط)	منفی	−	−	+	−	−	+	۱۳
۹۲۷/۱ ± ۰۴۲/۰ (متوسط)	مثبت	−	+	−	+	+	−	۱۴
۳۵۷/۲ ± ۰۳۸/۰ (قوی)	منفی	−	−	−	−	−	−	۱۵
۴۹۷/۲ ± ۰۵۸/۰ (قوی)	منفی	−	−	−	−	−	−	۱۶
۲۰۰/۲ ± ۰۴۰/۰ (قوی)	مثبت	−	−	−	−	−	−	۱۷
۰۳۰/۲ ± ۰۴۰/۰ (متوسط)	مثبت	−	−	−	−	−	+	۱۸
۰۰۷/۲ ± ۰۵۱/۰ (متوسط)	منفی	−	−	−	−	−	+	۱۹
۹۹۷/۱ ± ۰۸۲/۰ (متوسط)	مثبت	−	−	−	−	+	−	۲۰
۱۳۶/۲ ± ۰۹۴/۰ (قوی)	منفی	−	+	+	+	+	−	۲۱
۱۰۱/۲ ± ۰۷۹/۰ (قوی)	مثبت	−	−	−	−	−	−	۲۲
۹۲۳/۱ ± ۰۳۱/۰ (متوسط)	مثبت	−	+	−	+	+	−	۲۳
۷۵۷/۱ ± ۰۷۱/۰ (متوسط)	مثبت	+	+	−	+	+	−	۲۴
۳۹۵/۲ ± ۰۰۶/۰ (قوی)	مثبت	+	+	+	+	+	+	۲۵
۱۰۷/۲ ± ۶۴/۰ (قوی)	منفی	−	−	+	−	−	+	۲۶
۷۱۴/۱ ± ۰۸۶/۰ (متوسط)	منفی	−	−	+	−	−	−	۲۷
۰۲۰/۱ ± ۰۴۴/۰ (ضعیف یا منفی)	مثبت	−	+	+	−	−	−	۲۸
۰۱۳/۲ ± ۰۸۹/۰ (متوسط)	منفی	−	+	+	−	−	−	۲۹
۹۸۷/۱ ± ۰۳۸/۰ (متوسط)	مثبت	+	+	−	+	+	−	۳۰

جدول ۳: الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

آنتی‌بیوتیک	تعداد جدایه حساس (٪)	تعداد جدایه نیمه‌حساس (٪)	تعداد جدایه مقاوم (٪)
اکسی‌تتراسایکلین	۱۲ (۴۰)	۲ (۶/۶۶)	۱۶ (۵۳/۳۳)
پنی‌سیلین	۳ (۱۰)	۰ (۰)	۲۷ (۹۰)
آزیترومایسین	۱۶ (۵۳/۳۳)	۲ (۶/۶۶)	۱۲ (۴۰)
کلیندامایسین	۲۰ (۶۶/۶۶)	۱ (۳/۳۳)	۹ (۳۰)
کلوگزاسیلین	۱۱ (۳۶/۶۶)	۱ (۳/۳۳)	۱۸ (۶۰)
فورازولیدون	۱۸ (۶۰)	۵ (۱۶/۶۶)	۷ (۲۳/۳۳)
متی‌سیلین	۱۸ (۶۰)	۲ (۶/۶۶)	۱۰ (۳۳/۳۳)
وانکومایسین	۳۰ (۱۰۰)	۰ (۰)	۰ (۰)

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک باکتری ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی شناخته شده است. این باکتری مهم‌ترین عامل ایجاد عفونت مجاری تحتانی تنفسی، عفونت زخم‌های پس از جراحی و همچنین دومین عامل ایجاد پنومونی، باکتریمی و عفونت‌های قلبی عروقی می‌باشد (۱۶). عفونت‌های ایجاد شده به وسیله این باکتری عمدتا به سختی درمان می‌شوند. این موضوع به دلیل مقاومت بالای این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌باشد. یکی از مهم‌ترین عوامل تهاجم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس توانایی تولید آنزیم بتا لاکتاماز است. باکتری به واسطه این آنزیم آنتی‌بیوتیک های دارای حلقه بتا لاکتام را تجزیه می‌کند و نسبت به آنها مقاوم می‌شود (۱۷). در مطالعه حاضر فراوانی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام (پنی‌سیلین) بسیار بالا و حائز اهمیت بود. همچنین ۷۰٪ جدایه‌ها قادر به تولید بتالاکتاماز بودند. احمدی و همکاران در مطالعه مشابه در سال ۱۳۹۲ روی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های بالینی بیمارستان امام رضا (ع) کرمانشاه گزارش کردند که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین با ۹۰٪ مقاومت و تتراسایکلین با ۷۶٪ مقاومت می‌باشد (۱۸). صفدری و همکاران در سال ۱۳۹۱ با مطالعه روی ۱۰۰ نمونه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیمارستان قائم مشهد میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و کلیندامایسین را به ترتیب ۹۷٪ و ۳۳٪ گزارش کردند (۱۹). این نتایج با آنچه ما گزارش کردیم تطابق داشته و بیانگر این موضوع می‌باشد که در سال‌های اخیر مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری نسبت به بتالاکتام‌ها افزایش چشمگیری داشته و بنابراین نیازمند کنترل و توجه ویژه می‌باشد. از فاکتورهای دیگر مورد مطالعه بررسی تولید همولیزین‌ها است. آلفا همولیزین به عنوان یک فاکتور تهاجم در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از اهمیت زیادی برخوردار است. این توکسین با ایجاد سوراخ به اندازه حدود ۱۲ انگستروم در دیواره سلول‌های مختلف از جمله گلبول‌های قرمز باعث نشت ترکیبات کوچکتر از ۲ کیلو دالتون و نهایتا لیز آنها می‌شود (۲۰). در مطالعه حاضر بلاد آگار گوسفندی ۸ جدایه (۲۶/۶۶٪) آلفا همولیزین مثبت بودند بیوفیلم همه جدایه‌های آلفا همولیزین مثبت متوسط یا قوی بود. Caiazza و Toole بیان کردند که تولید بیوفیلم با ایجاد آلفا همولیزین در ارتباط است؛ به این صورت آلفا همولیزین به ایجاد ارتباط سلول به سلول که مرحله اولیه تشکیل بیوفیلم است، کمک می‌کند (۲۱). اما با توجه به اینکه تشکیل بیوفیلم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تحت تاثیر فاکتورهای زیادی از جمله فاکتورهای محیطی و سطح تشکیل بیوفیلم است (۱۴)، بنابراین نمی‌توان انتظار داشت که همه سویه‌های آلفا همولیزین مثبت در محیط TSB و روی سطح پلی‌استرن میکروپلیت (شرایط محیطی مطالعه حاضر) بیوفیلم قوی تشکیل دهند. در یک مطالعه مشابه که توسط Ebrahimi و همکاران روی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از پوست و زخم انجام گرفت ۴۸/۸٪ جدایه‌ها آلفا همولیزین مثبت بودند؛ همچنین گزارش کردند که ۹۵٪ جدایه‌های آلفا همولیزین مثبت قادر به تشکیل بیوفیلم هستند (۲۲). در مطالعه حاضر میزان تولید بتا همولیزین در بلاد آگار گوسفندی ۴۶/۶۶ بود که با تعداد گزارش شده در مطالعه Ebrahimi و همکاران (۴۸/۸٪) هم‌خوانی دارد. نقش بتا همولیزین در بیماری‌زایی استافیلوکوکوس اورئوس به درستی مشخص نشده است و مطالعات نشان می‌دهد که دارای عملکرد فسفولیپازی می‌باشد (۲۲). در مطالعه حاضر فراوانی تولید دلتا همولیزین در بلاد آگار گوسفندی ۵۰٪ بود. این میزان در مطالعه Ebrahimi و همکاران ۱۲/۲۵٪ بود (۲۲). با توجه به اینکه از یک سو تولید دلتا توکسین در کنترل accessory gene regulator (agr) می‌باشد (۲۳) و تولید این توکسین وابسته به فعالیت agr می‌باشد و از سوی دیگر بیان ژن‌های agr باعث سرکوب تولید بیوفیلم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌شوند (۲۴)، در مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری بین توانایی تولید دلتا توکسین و تشکیل بیوفیلم مشاهده نشد. توجیه علمی این موضوع احتمالا به دلیل نقش فاکتورهای مختلف در تشکیل بیوفیلم است و زمانی می‌توان بیوفیلم جدایه‌های مختلف را با هم مقایسه کرد که برهم‌کنش تمام فاکتورهای دخیل بررسی گردد. از لحاظ تشکیل بیوفیلم بیشتر جدایه‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم بودند به طوری که از بین تمام جدایه‌ها فقط یکی از آنها (۳/۳۳٪) بیوفیلم ضعیف داشت. توانایی تشکیل بیوفیلم باکتری‌های جدا شده از بیمارستان از اهمیت بالایی برخوردار است به دلیل اینکه این باکتری‌ها می توانند تشکیل ساختارهای بیوفیلمی مقاوم به آنتی‌بیوتیک را بدهند و زمینه ساز ایجاد عفونت‌های مزمن بیمارستانی باشند. به همین دلیل مطالعات زیادی در سراسر جهان در زمینه بیوفیلم باکتری‌های بیمارستانی از جمله استافیلوکوکوس اورئوس انجام می‌شود (۲۶،۲۵). جهت بررسی توانایی ایجاد بیوفیلم توسط استافیلوکوکوس اورئوس را روش‌های مختلفی مانند میکروتیتر پلیت، کنگو رد آگار و تعیین حضور ژن‌های وابسته به بیوفیلم انجام می‌شود اما روش میکروتیتر پلیت از بقیه قابل اعتمادتر می‌باشد (۱۴). Mirzaee و همکاران تعداد ۶۰ جدایه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از دو مرکز درمانی واقع در شهر تهران را از نظر توانایی تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت بررسی کردند. نتایج مطالعه مذکور نشان داد که ۴۶٪ جدایه‌ها بیوفیلم قوی، ۳۶/۵٪ متوسط و ۱۷/۵٪ ضعیف هستند. در مطالعه Mirzaee و همکاران جدایه‌ی فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم یافت نشد. با توجه به سویه کنترل منفی مورد استفاده در مطالعه آنها (Staphylococcus epidermidis ATCC 12228) که مشابه سویه مورد استفاده در مطالعه حاضر بود (۲۷)، می‌توان نتایج مطالعه Mirzaee و همکاران را با مطالعه حاضر مقایسه کرد؛ که درصدهای گزارش شده کاملا هم‌خوانی دارد.

نتیجه‌گیری

در نهایت مطالعه حاضر نشان داد که فراوانی فاکتورهای تهاجم بررسی شده در جدایه‌ها بالا می‌باشد بنابراین باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شده در مطالعه حاضر به صورت بالقوه توانایی بالایی جهت ایجاد عفونت‌های بیمارستانی دارند.

نکته حائز اهمیت مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی، فراوانی زیاد بتالاکتاماز مثبت‌ها و بیوفیلم مثبت‌ها می‌باشد. پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در زمینه بررسی سایر فاکتورهای حدت *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* بیمارستانی مانند عوامل چسبندگی و فاکتورهای دخیل در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی صورت پذیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله بخشی از پایان‌نامه دکترای تخصصی باکتری‌شناسی آقای آرام شریفی می‌باشد و نویسندگان از حمایت‌های مالی معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه بوعلی سینا همدان نهایت تقدیر و تشکر را دارند.

References

1. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine* 1998; **339**: 520-532.
2. Arvidson S, Tegmark K. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology* 2001; **291**(2): 159-170.
3. Sina H, Ahoyo TA, Moussaoui W, Keller D, Bankolé HS, Barogui Y, et.al. Variability of antibiotic susceptibility and toxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from skin, soft tissue, and bone related infections. *BMC Microbiology* 2013; **13**(1): 188.
4. Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs P, Teixeira P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiology* 2009; **26**(3): 278-282.
5. Sharma S, Verma KK. Skin and soft tissue infection. *Indian Journal of Pediatrics* 2001; **68**: 46-50.
6. Alfatemi SM, Motamedifar M, Hadi N, Saraie HS. Analysis of virulence genes among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2014; **7**(6): 46-50.
7. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* 2011; **2**(5): 445-459.
8. Boles BR, Horswill AR. Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends in Microbiology* 2011; **19**(9): 449-455.
9. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. ASM Press; 2003.
10. Nemati M, Hermans K, Devriese LA, Maes D, Haesebrouck F. Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from poultry Avian. *Pathology* 2009; **38**(6): 513-517.
11. Hebert GA, Hancock GA. Synergistic hemolysis exhibited by species of staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology* 1985; **22**(3): 409-415.
12. Franklin R, Cockerill III. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty First Informational Supplement, M100S21. Clinical and Laboratory Standards Institute; Wayne, PA, USA, 2011.
13. Sng EH, Yeo KL, Rajan VS. Simple method for detecting penicillin's-producing *Neisseria gonorrhea* and *Staphylococcus aureus*. *The British Journal of Venereal Diseases* 1981; **57**(2): 141-142.
14. Atshan SS, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Lung LT, Hamat RA, Karunanidhi A, et.al. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International* 2012.
15. Snel GG, Malvisi M, Pilla R, Piccinini R. Evaluation of biofilm formation using milk in a flow cell model and microarray characterization of *Staphylococcus aureus* strains from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 2014; **174**(3): 489-495.
16. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the United States. *Pediatrics* 1999; **103**(4): 39.
17. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation* 2003; **111**(9): 1265.
18. Ahmadi, Z, Elaheh T, Hassan M. Detection of the antibiotic resistance pattern in staphylococcus aureus isolated from clinical samples obtained from patients hospitalized in Imam Reza hospital, Kermanshah. *Iranian Journal of Public Health* 2014; **43**(2): 209-311.
19. Safdari H, Sadeghian A, Tahaghogi S. The antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from patients in Quaem University hospital during 2009-2011. *Journal of Paramedical Science and Rehabilitation* 2012; **1**(1): 43-46.
20. Vandenesch F, Lina G, Henry T. *Staphylococcus aureus* hemolysis, bi-component leukocidins, and cytolyses peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2012; **2**: 80.
21. Caiazza NC, O'Toole GA. Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 2003; **185**(10): 3214-3217.
22. Ebrahimi A, Ghasemi M, Ghasemi B. Some virulence factors of Staphylococci isolated from wound and skin infections in Shahrekord, IR Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2014; **7**(4): 1-5.

23. Janzon L, Arvidson S. The role of the delta-lysin gene (hld) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *The EMBO Journal* 1990; **9**(5): 1391.
24. Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, et.al. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Bacteriology* 2004; **186**(14): 4665-4684.
25. Rezaei M, Moniri R, Mousavi SG, Shiade MJ. Prevalence of biofilm formation among methicillin resistance *Staphylococcus aureus* isolated from nasal carriers. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2013; **6**(6): 65-72.
26. Smith K, Perez A, Ramage G, Lappin D, Gemmell CG, Lang S. Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology* 2008; **57**(8): 1018-1023.
27. Mirzaee M, Najar Peerayeh S, Ghasemian AM. Detection of icaABCD genes and biofilm formation in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Pathology* 2014; **9**(4): 257-262.