



## Prevalence of ica operon related genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates

Fatemeh Shahkarami<sup>1</sup>, Ahmad Rashki<sup>2</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Basic Science, University of Zabol, Iran

2. Department of Physiopathology, Faculty of Vet-Medicine, University of Zabol, Iran

### Article Information

#### Article history:

Received: 2014/05/25

Accepted: 2015/10/13

Available online: 2016/01/10

#### Article Subject:

Medical Bacteriology

IJMM 1394; 9(4): 16-23

#### Corresponding author at:

Ahmad Rashki

Faculty of Veterinary  
Medicine, Department of  
Physiopathology, University of  
Zabol, Zabol, Iran

#### Tel:

+98 915 1970877

#### Email:

ah\_rashki@usal.es

### Abstract

**Background and Aim:** Infections caused by *Staphylococcus* species associated with biofilm are considered as a serious clinical concern in medical devices used patients with serious clinical illness and are usually possible source of nosocomial infections. The polysaccharide adhesion mechanism encoded by the ica operon generate a direct role in biofilm formation and infection of the bacteria. In this study, the presence of ica operon were studied in clinical isolates of *S. aureus* and *S. epidermidis* in relation to the biofilm formation.

**Materials and Methods:** In this study, the 27 *S. aureus* isolates and 73 *S. epidermidis* isolates were identified by conventional biochemical methods. The ability to biofilm formation was evaluated by colony morphology on Congo red agar (CRA) and test tube. Presence of the ica genes was detected by PCR method.

**Results:** In this study, from 27 *S. aureus* isolates and 73 *S. epidermidis*, 25 (93%) and 70 (96%) isolates had the ability to form biofilms respectively. Genetic analysis showed that icaRADBC operon was present in 4 and 11% of *S. aureus* isolates and *S. epidermidis* isolates respectively. The *S. epidermidis* isolates were more frequently positive for *icaA*, *icaB* and *icaC* than *S. aureus* while the most prevalent gene was *icaD* found in 30% of the *S. aureus* isolates.

**Conclusions:** The results obtained showed that in consistent with other researches; biofilm formation in *Staphylococcal* isolates was not associated with present of ica operon and presumably depend on several factors.

**Key Words:** Biofilm, ica operon, Phenotype, *Staphylococcus*

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

### How to cite this article:

Shahkarami F, Rashki S. Prevalence of ica operon related genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. Iran J Med Microbiol. 2016; 9 (4) :16-23



## فراوانی ژن های اپرون ica در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس

فاطمه شاهکرمی<sup>۱</sup>، احمد راشکی<sup>۲</sup>

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، ایران.  
۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، ایران.

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و هدف:** عفونت های ناشی از گونه های استافیلوکوکوس مرتبط با بیوفیلم همچنان به عنوان یک نگرانی بالینی جدی در بیماران استفاده کننده از ابزارهای پزشکی مطرح بوده و به عنوان منبعی برای ایجاد عفونت های بیمارستانی محسوب می گردند. ژن های مربوط به اپرون ica پلی ساکاریدهای چسبنده بین سلولی را تولید می کنند که مستقیماً در تشکیل بیوفیلم و عفونت زایی این باکتری نقش اصلی را دارد. در این مطالعه به بررسی میزان حضور ژن های اپرون ica مرتبط با بیوفیلم و بررسی توانایی اتصال و پتانسیل تولید بیوفیلم در ایزوله های بالینی ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس پرداخته شده است.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تعداد ۲۷ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس و ۷۳ ایزوله استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس با روش های بیوشیمیایی معمول تعیین هويت شدند. توانایی تشکیل بیوفیلم با استفاده از دو روش کنگورد و لوله ای بررسی شد. سپس با استفاده از روش PCR حضور ژن های اپرون ica در تمام ایزوله ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته ها:** در این بررسی از تعداد ۲۷ و ۷۳ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به ترتیب ۲۵ و ۷۰ ایزوله توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند. آنالیز ژنتیکی نشان داد که اپرون icaADBC به ترتیب در ۴٪ و ۱۱٪ ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس و اپیدرمیدیس یافت شدند. میزان فراوانی icaA، icaB و icaC در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بیشتر از استافیلوکوکوس اورئوس بود در حالیکه ژن icaD در ۳۰٪ ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده گردید.

**نتیجه گیری:** نتایج به دست آمده نشان داد که مطابق با مطالعات دیگر؛ تشکیل بیوفیلم در ایزوله استافیلوکوکی با حضور اپران ica همراه نیست و احتمالاً به عوامل متعددی بستگی دارد.

**کلمات کلیدی:** بیوفیلم، اپرون ica، فنوتیپ، استافیلوکوکوس

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۰۴

پذیرش: ۱۳۹۳/۰۷/۲۰

انتشار آنلاین: ۱۳۹۳/۱۰/۲۰

### موضوع:

باکتری شناسی پزشکی

IJMM 1394; 9(4): 16-23

### نویسنده مسئول:

دکتر احمد راشکی

زابل - دانشگاه زابل - دانشکده دامپزشکی.

تلفن: ۰۹۱۵۱۹۷۰۸۷۷

پست الکترونیک:

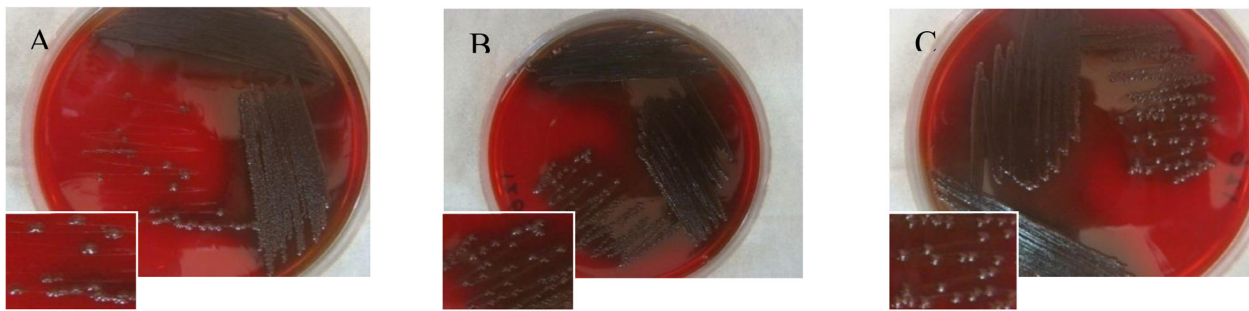
ah\_rashki@usal.es

### مقدمه

های اصلی توسعه عفونت های بیمارستانی توانایی تشکیل بیوفیلم است که باعث تسهیل چسبندگی باکتریایی به سطوح مختلف دستگاه ها پزشکی، می شود.

توانایی تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح وسایل پزشکی از جمله کاتترها و دریچه مصنوعی قلب در سوپه های استافیلوکوکوس اورئوس و اپیدرمیدیس متفاوت است (۵، ۶). ژن های کنترل کننده تولید slime در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس می تواند در تشکیل بیوفیلم دخیل باشد (۷). ژن هایی که مهمترین مواد تشکیل دهنده بیوفیلم (پروتئین ها و پلی ساکارید چسبنده) را کد می کنند متعلق به اپرون ica می باشند. این اپرون

گونه های جنس استافیلوکوک یکی از شایع ترین عوامل بروز عفونت های بیمارستانی در دنیا می باشند (۱، ۲). بروز عفونت های استافیلوکوکوسی در سال های اخیر به دلیل انتشار سوپه های مقاوم، افزایش بیماران با ضعف ایمنی و استفاده بیش از حد از وسایل پزشکی مانند کاتتر رو به افزایش است (۳). در میان گونه های استافیلوکوکوسی، استافیلوکوکوس اورئوس دارای بیشترین توانایی بیماری زایی است. استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بعنوان یکی از علل عفونت های بیمارستانی، بخش مهمی از فلور باکتریایی نرمال در پوست و غشاهای موکوزی را تشکیل می دهد (۴). یکی از مکانیسم



تصویر شماره ۳: تشکیل بیوفیلم به روش کنگورد: A: بیوفیلم ضعیف - B: بیوفیلم متوسط - C: بیوفیلم قوی

#### آزمون تشخیص بیوفیلم

##### روش لوله ای (TM)

یکی از روش های کیفی تشخیص بیوفیلم روش لوله ای است. در این روش یک لوپ پر از میکروارگانیزم در ۱۰ میلی لیتر محیط (TSB: Trypticase Soy Broth) کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  گرماگذاری شد. پس از ۲۴ ساعت محتویات داخل لوله ها را دور ریخته و لوله ها با (1X: PBS phosphate buffer saline) شستشو داده و در محیط آزمایشگاه خشک شد. پس از خشک شدن لوله ها آنها را با کریستال ویوله ۱٪ به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی گردید.

##### روش کنگورد (CRA)

در این روش باکتری ها روی محیط جامد BHI حاوی ۰/۸ درصد رنگ کنگورد کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه گرماگذاری گردید. سپس تشکیل بیوفیلم بر روی پلیت مورد بررسی قرار گرفت (۱۳).

##### استخراج DNA ژنومی

ابتدا استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش فنل - کلروفرم به شرح ذیل انجام شد (۱۴). ابتدا یک کلنی از ایزوله های تعیین هویت شده در ۵ میلی لیتر محیط مایع (Brain Heart Infusion) به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در گرم خانه شیکردار کشت داده شد. جدا سازی باکتری ها از محیط مایع با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۴۸۰۰ در دقیقه به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت و سپس به رسوب حاصله ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE اضافه گردید. سپس به سوسپانسیون حاصله (جهت لیز سلولی و آزاد کردن محتویات آن) مقدر ۰/۱ حجم محلول، SDS ۱۰٪ افزوده گردید و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای  $56^{\circ}\text{C}$  گرما گذاری شد. فنل اشباع و کلروفرم به نسبت مساوی و به اندازه حجم سوسپانسیون به لوله ها اضافه شد و مدت ۵ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ به آرامی به لوله جدید منتقل گردید و هم حجم آن کلروفرم اضافه شد. لوله ها به مدت ۱۵

شامل ژن های *icaABCD* و ژن تنظیم کننده *icaR* است که از رونویسی اپرون *ica* جلوگیری می کند. نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده روی مراحل تشکیل بیوفیلم نشان می دهد که تجمع سلولی، انباشت بیوفیلم و سنتز کپسول پلی ساکارید (PIA) به واسطه اپرون *ica* انجام می شود (۸-۱۱). *Los* و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش کردند که بعضی استافیلوکوکوس های حاوی اپرون *ica* توانایی تولید بیوفیلم را نداشتند (۱۲).

بیوفیلم به عنوان مهمترین عامل در بیماری های انسانی و عفونت ها شناخته می شوند (۴). به نظر می رسد تعداد بیماری های مرتبط با بیوفیلم رو به افزایش است. شناخت ویژگی های رشد بیوفیلم و جنبه های مختلف تشکیل بیوفیلم برای درمان موفقیت آمیز عفونت مهم است. استفاده از روش های آزمایشگاهی رایج مانند لوله ای، کنگورد و پلیت، همراه با استفاده از روش PCR برای تشخیص توانایی تشکیل بیوفیلم در باکتری های استافیلوکوکوس / اورئوس و اپیدرمیدیس از اهمیت به سزایی برخوردار است. هدف از انجام این مطالعه، تعیین فراوانی ژن های تشکیل دهنده اپرون *ica* و ارتباط آن با تشکیل بیوفیلم در استافیلوکوکوس اورئوس و اپیدرمیدیس جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان های آموزشی زابل بود.

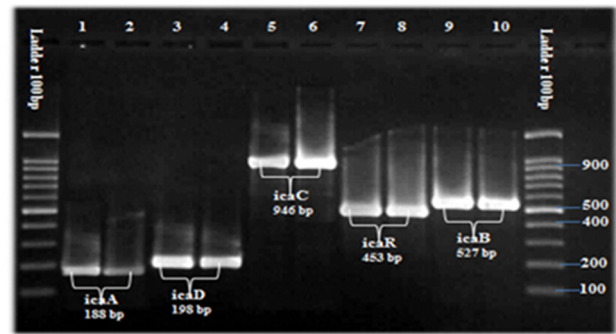
#### مواد و روش ها

##### جمع آوری نمونه ها

این مطالعه توصیفی بر روی ۲۵۰ نمونه گرفته شده از نمونه های کلینیکی بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های شهرستان زابل در فاصله زمانی فروردین ۱۳۹۱ تا شهریور ۱۳۹۱ انجام پذیرفت. نمونه های جمع آوری شده به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه زابل منتقل شده و ابتدا روی محیط های آگار خونی، مانیتول سالت آگار در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۸-۲۴ ساعت گرما گذاری شدند.

کلنی های رشد کرده روی محیط مانیتول سالت آگار با انجام تست های بیوشیمیایی نظیر کاتالاز، کوآگولاز، اوره از، DNase، حساسیت به نووبیوسین و باسیتراسین تعیین هویت گردید.

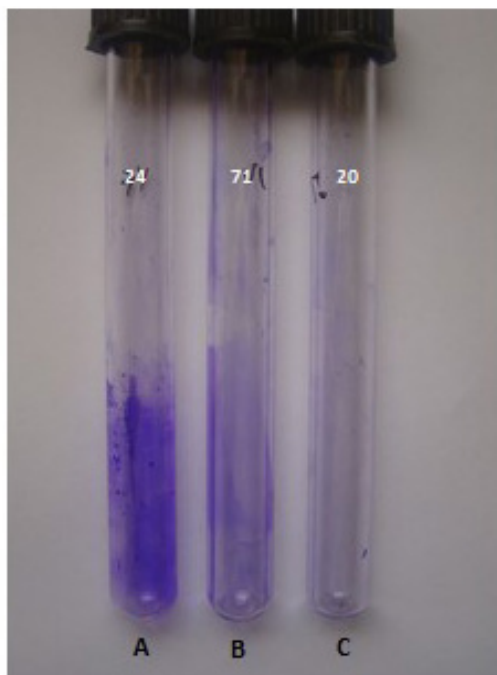
ثانیه به آرامی تکان داده شد و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ گردید. فاز رویی دوباره به لوله جدید منتقل شد و ۰/۱ حجم محلول، استات سدیم ۳ M اضافه گردید. سپس ۲-۲/۵ برابر حجم آن، اتانول مطلق سرد اضافه گردید. لوله ها به آرامی بین انگشتان دست به مدت ۱۰ ثانیه را تکان داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۲۰- قرار گرفت. سپس لوله ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه در دمای °C ۴ سانتریفیوژ شد. رسوب حاصله با ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد. در پایان، رسوب DNA خشک شده با ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE حل و در دمای °C ۲۰- نگهداری شد. جهت تایید غلظت مناسب DNA استخراجی، تمامی نمونه ها توسط دستگاه نانودراپ



تصویر شماری ۱: نمونه ای از تکثیر ژن های اپرون ica را نشان می دهد. چاهک ۱ و ۲ ژن ica با ۱۸۸ جفت باز چاهک ۳ و ۴ ژن icaD با ۱۹۸ جفت باز چاهک ۵ و ۶ ژن icaC با ۹۴۶ جفت باز چاهک ۷ و ۸ ژن icaR با ۴۵۳ جفت باز و چاهک ۹ و ۱۰ ژن icaB با ۵۲۷ جفت باز

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

ژن	اندازه قطعه (bp)	توالی پرایمر (۵' به ۳')	منبع
<i>icaA</i>	188 bp	F ACACTTGCTGGCGCAGTCAA R TCTGGAACCAACATCCAACA	این مطالعه
<i>icaD</i>	198 bp	F ATGGTCAAG CCCAGACAGAG R AGT ATT TTCGTTTAAAGC AA	این مطالعه
<i>icaB</i>	527 bp	F ATGGCTTAAAGCACACGCGC R TATCGG CATCTGGTGTGACAG	این مطالعه
<i>icaC</i>	936 bp	F ATCATCGTGACACACTTACTAACG R CTCTCTTAACATCATCCGACGCC	این مطالعه
<i>icaR</i>	453 bp	F TACTGTCTCAATAATCCCGAA R GGTACGATGGTACTACACTTGATG	این مطالعه



تصویر شماری ۲: تشکیل بیوفیلم به روش لوله ای - A: بیوفیلم قوی - B: بیوفیلم متوسط - C: بیوفیلم منفی

در نسبت A۲۶۰ به A۲۸۰ اندازه گیری شد.

#### فراوانی ژن های اپرون ica

برای شناسایی ژن های اپرون ica در ایزوله های استافیلوکوکوس جدا شده از تکنیک PCR استفاده شد (۱۶, ۱۵). توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه در جدول ۱ آمده است. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف انجام گردید. جهت انجام PCR آنزیم MasterMix Red ۲× از شرکت آمیکون کشور دانمارک خریداری گردید. در این واکنش، دو میکرولیتر از DNA الگو، ۱۲/۵ میکرولیتر از آنزیم MasterMix Red ۲× و ۱ میکرولیتر (۱۰ پیکو مول) از هر پرایمر را با هم مخلوط و حجم نهایی آن با آب مقطر دو بار تقطیر به ۲۵ میکرو لیتر رسانده شد. برنامه اجرایی سیکل های PCR واجد مراحل زیر بود. واسرشتگی اولیه در دمای °C ۹۵ به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل حرارتی شامل: واسرشتگی در دمای °C ۹۴ به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر به DNA الگو برای ژن *icaA* (°C ۵۸ به مدت ۱ دقیقه)، برای ژن *icaB* و *icaC* (°C ۵۶ به مدت ۱ دقیقه)، برای ژن *icaR* (°C ۵۹ به مدت ۱ دقیقه و ۶۰ °C به مدت ۱ دقیقه) و برای ژن *icaB* و *icaC* (°C ۵۶ به مدت ۱ دقیقه) و طولی شدن رشته الگو تکثیر در °C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه و در پایان

جدول ۱: تعداد و درصد ژن های اپرون ica در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس تشکیل دهنده بیوفیلم

میکروارگانسم	توانایی تشکیل بیوفیلم		وجود اپرون ica											
	CRA <sup>+</sup>	TM <sup>+</sup>	icaA	icaC	icaD	icaR	اپرون ica							
استافیلوکوکوس اورئوس (۳۷)	25	23	6	4	8	3	3							
	93%	85%	22%	15%	30%	11%	11%							
	TM <sup>+</sup>	CRA <sup>+</sup>	TM <sup>+</sup>	CRA <sup>+</sup>	TM <sup>+</sup>	CRA <sup>+</sup>	TM <sup>+</sup>	CRA <sup>+</sup>	TM <sup>+</sup>	CRA <sup>+</sup>	TM <sup>+</sup>	CRA <sup>+</sup>	TM <sup>+</sup>	CRA <sup>+</sup>
	3	5	1	3	4	1	8	1	3	1	3	1	3	-
P-value	1.0000	0.4965	1.0000	1.0000	1.0000	0.6144	1.0000	0.1147	1.0000	0.0279	1.0000	0.6144	1.0000	0.2396
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (۲۳)	70	48	11	11	8	8	3							
	96%	66%	15%	15%	11%	11%	4%							
	TM <sup>+</sup>	CRA <sup>+</sup>	TM <sup>+</sup>	CRA <sup>+</sup>	TM <sup>+</sup>	CRA <sup>+</sup>	TM <sup>+</sup>	CRA <sup>+</sup>	TM <sup>+</sup>	CRA <sup>+</sup>	TM <sup>+</sup>	CRA <sup>+</sup>	TM <sup>+</sup>	CRA <sup>+</sup>
	10	10	5	10	8	5	3	8	3	8	4	8	3	2
P-value	1.0000	0.4965	1.0000	1.0000	0.7794	0.8020	0.1595	1.0000	0.7616	1.0000	0.5234	1.0000	1.0000	1.0000

ایزوله (۸۵٪) مثبت و ۴ ایزوله (۱۵٪) منفی و از ۷۳ ایزوله استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ۴۸ ایزوله (۶۶٪) مثبت و ۲۵ ایزوله (۳۴٪) منفی ارزیابی شدند. در مجموع از ۱۰۰ ایزوله مورد مطالعه ۷۱٪ مثبت و ۲۹٪ منفی بودند.

در روش CRA از ۲۷ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵ ایزوله (۹۳٪) مثبت و ۲ ایزوله (۷٪) منفی و از ۷۳ ایزوله استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ۷۰ ایزوله (۹۶٪) مثبت و ۳ ایزوله (۴٪) منفی ارزیابی شدند. در مجموع از ۱۰۰ ایزوله ۹۵٪ مثبت و ۵٪ منفی بودند (جدول ۲).

نتایج بدست آمده از بررسی میزان فراوانی ژن های اپرون ica نشان می دهد که از ۲۷ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس بالاترین فراوانی مربوط به ژن *icaD* (۳۰٪) بوده و ژن های *icaA* (۲۲٪)، *icaB* (۱۱٪)، *icaC* (۱۵٪) و *icaR* (۱۱٪) به ترتیب در مرتبه های بعدی قرار دارند. از میان ۷۳ استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از نمونه های کلینیکی ۱۱٪، ۱۴٪، ۱۵٪، ۱۵٪ و ۱۱٪ به ترتیب حاوی ژن های *icaA*، *icaB*، *icaD*، *icaC* و *icaR* بودند. از مجموع ۱۰۰ ایزوله جدا شده (۲۷ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس و ۷۳ استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس) توزیع فراوانی ژن های مورد مطالعه به صورت ۱۱٪ *icaR*، ۱۲٪ *icaC*، ۱۴٪ *icaB*، ۱۹٪ *icaD* و ۱۶٪ *icaA* مشاهده شد (جدول ۲).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که میزان فراوانی ژن های اپرون ica با نتایج فنوتیپی تشکیل بیوفیلم همخوانی معنی داری نداشت (جدول ۲). همچنین *icaAD*<sup>+</sup> و *icaDBCR*<sup>+</sup> به

دمای طولی شدن نهایی در ۷۲ °C به مدت ۷ دقیقه انجام شد. پس از انجام PCR، ۵ میکرولیتر از محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۲٪ به مدت ۸۰ دقیقه تحت تاثیر ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شد. قطعات تکثیر شده پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با دستگاه (Gel Documentation UVITEC, Cambridge) مشاهده شد. همچنین از مارکر ۱۰۰ bp برای تایید وزن مولکولی محصولات PCR استفاده گردید (تصویر ۱). در پایان نتایج با استفاده از آزمون فیشر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

## یافته ها

جهت انجام تست های فنوتیپی از دو روش TM و CRA استفاده گردید. در روش TM بعد از رنگ آمیزی لوله ها دو بار با آب مقطر دوبار یونیزه شستشو داده شدند. تشکیل بیوفیلم به صورت یک لایه رنگ گرفته بر روی سطح داخلی دیواره لوله مشاهده شد که میزان تشکیل آن به صورت (+، ++، +++) در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از تولید کمی بیوفیلم به روش TM در جدول ۲ و تصویر ۲ نشان داده شده است.

در روش CRA بعد از کشت ایزوله های باکتریایی بر روی محیط کنگو رد کلنی های صورتی بیوفیلم منفی، کلونی های صورتی بر روی زمینه محیط سیاه بیوفیلم +، کلونی های سیاه بر روی زمینه محیط صورتی بیوفیلم ++ و کلونی های سیاه بر روی زمینه محیط سیاه بیوفیلم +++ ارزیابی گردید. تولید کیفی به روش CRA در جدول ۳ و تصویر ۳ نشان داده شده است.

در روش TM از ۲۷ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس ۲۳

ترتیب در ۸٪ و ۹٪ ایزوله ها مشاهده شد.

## بحث

عوامل محیطی مثل غلظت آنتی بیوتیک در بدن بیمار هنگام نمونه برداری، درجه حرارت بالا، حضور قند و غیره باشد (۲۴).

به طور خلاصه مطالعه حاضر فراوانی پایین حضور ژن های اپرون ica را در بین دو گونه مورد مطالعه تشکیل دهنده بیوفیلیم نشان داد. با توجه به نتایج این مطالعه پیشنهاد می شود که تشکیل بیوفیلیم در گونه های استافیلوکوکی ممکن است چندعاملی باشد و عمیقاً تحت تاثیر محیط قرار میگیرد. در حالی که حضور اپرون ica در تولید بیوفیلیم ممکن است دارای اهمیت باشد، اما نقش سایر عوامل و همکاری آنها هنوز به طور کامل روشن نشده است. از آنجا که تنوع ژنتیکی بالایی در بین جدایه استافیلوکوکی جمع آوری شده از نمونه های بالینی دیده می شود، پیشنهاد می گردد که مشابه تحقیق حاضر بر روی گونه های استافیلوکوکی شناخته شده آزمایشگاهی انجام گیرد. بنابر این روش استفاده از یافته های ژنتیکی برای تشخیص توانایی تشکیل بیوفیلیم در بین ایزوله های استافیلوکوکی مناسب نیست.

## تقدیر و تشکر

این پژوهش بخشی از پایان نامه فاطمه شاهکرمی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه زابل می باشد. بدینوسیله از اساتید و کارکنان دانشکده دامپزشکی و گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه زابل که امکانات لازم را جهت انجام این پژوهش فراهم نمودند سپاسگزاری می شود.

## Reference

- Kilic A, Basustaoglu AC. Double triplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus haemolyticus* and determination of their methicillin resistance directly from positive blood culture bottles. *Res Microbiol*. 2011;162(10):1060-6.
- Jadhav S, Hussain A, Devi S, Kumar A, Parveen S, Gandham N, et al. Virulence characteristics and genetic affinities of multiple drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* from a semi urban locality in India. *PLoS One*. 2011;6(3):e18063.
- Liu W, Vives-Bauza C, Acin-Perez R, Yamamoto A, Tan Y, Li Y, et al. PINK1 defect causes mitochondrial dysfunction, proteasomal deficit and alpha-synuclein aggregation in cell culture models of Parkinson's disease. *PLoS One*. 2009;4(2):e4597.

توانایی چسبیدن و تشکیل بیوفیلیم روی مخاط و وسایل پزشکی یکی از فاکتور های اصلی ویروانسان در گونه های استافیلوکوکی می باشد. بیوفیلیم باعث می شود تا باکتری در برابر عواملی چون حضور آنتی بیوتیک ها ، استرس های محیطی ، عوامل فاگوسیت کننده و پاسخ ایمنی میزبان مقاومت کند. مطالعه توانایی تشکیل بیوفیلیم و مشخص کردن ژن های دخیل در آن در ایزوله های مختلف استافیلوکوکی ممکن است به فهم بهتر فرایند تشکیل بیوفیلیم و به دنبال آن عفونت کمک کند. امروزه برای سنجش توانایی تشکیل بیوفیلیم، از تعیین میزان حضور ژن های اپرون ica و تست کیفی کنگورد آگار ، تست کمی TCP و روش پلیت استفاده می شود. در مطالعه حاضر تولید بیوفیلیم به دو روش (لوله ای و کنگورد آگار) با شدتهای مختلف مشاهده شد. پژوهش حاضر نشان داد که از بین ۲۷ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس ۲۲٪ دارای icaA، و ۳۰٪ دارای icaD، ۱۱٪ دارای icaB، ۱۵٪ دارای icaC و ۱۱٪ دارای icaR بودند. از مجموعه ۷۳ استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده، ۱۴٪، ۱۵٪، ۱۱٪ و ۱۱٪ به ترتیب حاوی ژن های icaC، icaD، icaA، و icaR بودند. نتایج حاصل از تولید بیوفیلیم به دو روش (لوله ای و کنگورد آگار) نشان می دهد که حدود ۷۰٪ استافیلوکوکوس اورئوس و ۸۵٪ استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس تشکیل دهنده بیوفیلیم فاقد اپرون ica بودند که ممکن است عوامل دیگری غیر از اپرون ica از جمله محیط (۱۷)، حضور گلوکز (۱۸)، pH، شرایط بافتهای بدن میزبان، وجود یا عدم وجود ژن *aap*، پراکسید هیدروژن (۱۹) و تولید بیوفیلیم از طریق مکانیسمهای مستقل از PIA (۲۰) در بروز تفاوت بین نتایج فنوتیپی و ژنوتیپی در تشکیل بیوفیلیم دخالت داشته باشد. Cramiton و همکاران در مطالعه خود گزارش کردند که عدم تشکیل بیوفیلیم در استافیلوکوکوس اورئوس ممکن است در نتیجه حذف اپرون ica باشد (۲۱). بر طبق یافته های Suzuki و همکاران حتی محل آناتومی و محیط فیزیولوژیکی که از آن نمونه ها جدا شده است ممکن است در تشکیل بیوفیلیم تاثیرگذار باشد به طوری که فراوانی اپرون ica در ایزوله های جدا شده از کیسه ملتحمه ۶۰٪ و در ایزوله های جدا شده از پوست ۱۵٪ گزارش شده است (۲۲).

یافته های Liduma و همکاران نشان داد در تشکیل بیوفیلیم ژن های icaA و aap نقش مهمی بازی می کنند، اما وجود این دو برای تشکیل بیوفیلیم کافی نیست. بطوریکه در سویه های icaA+/aap+ بیوفیلیم منفی مشاهده شد (۲۳). در یافته های مطالعه حاضر همه ایزوله های icaABCD+ دارای بیوفیلیم مثبت ارزیابی شدند فقط ۱ ایزوله icaA+ با بیوفیلیم منفی مشاهده شد که مطابق با یافته های Frebourg و همکاران شاید نتیجه تاثیرات

4. El Farran CA, Sekar A, Balakrishnan A, Shanmugam S, Arumugam P, Gopalswamy J. Prevalence of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* in the healthy skin of individuals in Tamil Nadu, India. *Indian J Med Microbiol.* 2013;31(1):19-23.
5. Eftekhari F, Speert DP. Biofilm formation by persistent and non-persistent isolates of *Staphylococcus epidermidis* from a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect.* 2009;71(2):112-6.
6. Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Campanile F, Amicosante G, Perilli MG, et al. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(12):1081-8.
7. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Rizzi S, Donati ME, Baldassarri L, et al. Search for the insertion element IS256 within the *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates collected from biomaterial-associated infections. *Biomaterials.* 2004;25(18):4117-25.
8. Chokr A, Watier D, Eleaume H, Pangon B, Ghnassia JC, Mack D, et al. Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Int J Med Microbiol.* 2006;296(6):381-8.
9. McKenney D, Hubner J, Muller E, Wang Y, Goldmann DA, Pier GB. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infect Immun.* 1998;66(10):4711-20.
10. Conlon KM, Humphreys H, O'Gara JP. *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol.* 2002;184(16):4400-8.
11. Conlon KM, Humphreys H, O'Gara JP. Regulation of *icaR* gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002 5;216(2):171-7.
12. Los R, Sawicki R, Juda M, Stankevic M, Rybojad P, Sawicki M, et al. A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2010 1;310(2):97-103.
13. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 1989;42(8):872-4.
14. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 2001.
15. Solati SM, Tajbakhsh E, Khamesipour F, Gugnani HC. Prevalence of virulence genes of biofilm producing strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in Iran. *AMB Express.* ;5(1):134.
16. Casagrande Proietti P, Stefanetti V, Hyatt DR, Marenzoni ML, Capomaccio S, Coletti M, et al. Phenotypic and genotypic characterization of canine pyoderma isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* for biofilm formation. *J Vet Med Sci.* 31;77(8):945-51.
17. 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*. *J Biomed Biotechnol.* 2012;976972.
18. Rodrigues AL, Pereira MA, Janknecht P, Brito AG, Nogueira R. Biofilms formed on humic substances: response to flow conditions and carbon concentrations. *Bioresour Technol.* 2010;101(18):6888-94.
19. Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Mahdouani K, Bakhrouf A. A microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. *New Microbiol.* 2010;33(2):137-45.
20. Stevens NT, Tharmabala M, Dillane T, Greene CM, O'Gara JP, Humphreys H. Biofilm and the role of the *ica* operon and *aap* in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing neurosurgical meningitis. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(7):719-22.
21. Crampton SE, Gerke C, Gotz F. In vitro methods to study staphylococcal biofilm formation. *Methods Enzymol.* 2001;336:239-55.

22. Suzuki T, Kawamura Y, Uno T, Ohashi Y, Ezaki T. Prevalence of *Staphylococcus epidermidis* strains with biofilm-forming ability in isolates from conjunctiva and facial skin. *Am J Ophthalmol.* 2005;140(5):844-50.
23. Liduma I, Tracevska T, Bers U, Zilevica A. Phenotypic and genetic analysis of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Medicina (Kaunas).* 2012;48(6):305-9.
24. Frebourg NB, Lefebvre S, Baert S, Lemeland JF. PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J Clin Microbiol.* 2000;38(2):877-80.