Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 6 (January - February)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

Isolation and identification of resistant bacteria from dental clinic and evaluation of biofilm formation by them

Seyedeh Zahra Hashemi Karoui[1], Rouha Kasra Kermanshahi[2], Hossein Fatholahzadeh[3], Sara Gharavi[1]

1. Department of Biotechnology, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran
2. Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran
3. Department of Radiology, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2016/03/16
Accepted: 2016/07/25
Available online: 2016/10/17

Article Subject:
Nosocomial Infection

IJMM 2017; 10(6): 25-33

Corresponding author at:

Seyedeh Zahra Hashemi Karoui

Biotechnology Department, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran

Tel: 0989111198046

Email:
s.hashemii@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Surface bacterial contamination has been shown to be a potential source of cross-infection. The aim of this study was to identify resistant bacterial isolates in the dental clinic before and after disinfection and evaluation of biofilm formation by them.

Materials and Methods: Sampling was performed at a dental clinic in Isfahan, Iran, on 2014. Samples were obtained by using swab and settle plate method. In the firs method, sterile swabs were used to sample of dental instrument and unit chair surface before and after disinfection, then swabs were transferred to TSB media (60 tubes). In the second method, air monitoring was carried out by settling blood agar and nutrient agar plates at the certain distance from the patient for 1 hour (24 plates). Then these samples incubated aerobically for 2 days at 37°C. Isolates were identified to species level with morphological and biochemical features and *16S ribosomal RNA* gene sequencing. In addition, the strength of biofilm formation by isolates was measured by using microtiter plate method.

Results: Most of these isolates were spore-forming *Bacillus* species and environmental *Staphylococcus* species. On the basis of the strength of biofilm formation, the most important identified bacteria were *Staphylococcus xylosus* and *Bacillus safensis*.

Conclusions: Bacteria that are able to form biofilm, can survive after disinfection of dental instruments and can enhance the risk of infection in dental practice by providing a surface for colonization of pathogens.

KeyWords: Biofilm, Dental Clinic, Resistant Bacteria, *Bacillus safensis*, *Staphylococcus xylosus*

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Hashemi Karoui SZ, Kasra Kermanshahi R, Fatholahzadeh H, Gharavi S. Isolation and identification of resistant bacteria from dental clinic and evaluation of biofilm formation by them. Iran J Med Microbiol. 2017; 10 (6): 25-33

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۶ – بهمن و اسفند ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم از محیط کلینیک دندانپزشکی و ارزیابی تشکیل بیوفیلم توسط آن‌ها

سیده زهرا هاشمی کرویی[۱]، روحا کسری کرمانشاهی[۲]، حسین فتح اله زاده[۳]، سارا غروی[۱]

۱. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۳. گروه رادیولوژی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۶
پذیرش:۱۳۹۵/۰۵/۰۴
انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۰۷/۲۶
موضوع:
عفونت های بیمارستانی

IJMM 1395; 10(6): 25-33

نویسنده مسئول:
سیده زهرا هاشمی کرویی

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۱۱۱۱۹۸۰۴۶

پست الکترونیک:
s.hashemii@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: آلودگی باکتریایی می‌تواند یکی از علل عفونت‌های متقاطع باشد .هدف از این مطالعه، شناسایی جدایه های باکتریایی مقاوم در محیط کلینیک دندانپزشکی قبل و بعد از گندزدایی و ارزیابی تشکیل بیوفیلم توسط آن‌هاست.

مواد و روش کار: نمونه‌گیری در سال ۱۳۹۲ دریکی از کلینیک‌های دندانپزشکی شهر اصفهان انجام گرفت. نمونه‌ها با استفاده از روش سوآب و روش پلیت گذاری جمع‌آوری شدند. درروش اول، نمونه‌ها با استفاده از سوآب‌های استریل از سطوح ابزار و یونیت دندانپزشکی، قبل و بعد از گندزدایی جمع‌آوری‌شده و سپس به محیط TSB تلقیح شدند (درمجموع ۶۰ لوله). درروش دوم، نمونه‌گیری از هوا با قرار دادن پلیت های نوترینت آگار و آگار خون‌دار در فاصله خاصی از بیمار به مدت ۱ ساعت انجام شد (درمجموع ۲۴ پلیت). سپس نمونه‌ها به مدت دو روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در شرایط هوازی گرما گذاری گردید. جدایه ها بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی و توالی یابی ژن *16S rRNA* تا سطح گونه شناسایی شدند. به‌علاوه قدرت تشکیل بیوفیلم توسط جدایه ها با روش میکروتیترپلیت سنجیده شد.

یافته‌ها: بیشتر جدایه ها، گونه‌های مولد اسپور باسیلوس و گونه‌های محیطی استافیلوکوک بودند. مهم‌ترین باکتری‌های شناسایی‌شده ازنظر قدرت تشکیل بیوفیلم، *Staphylococcus xylosus* و *Bacillus safensis* بودند.

نتیجه‌گیری: باکتری‌هایی که قادر به تشکیل بیوفیلم هستند، می‌توانند بعد از گندزدایی تجهیزات دندانی زنده بمانند و با فراهم کردن بستری برای استقرار عوامل عفونی، خطر انتقال عفونت در طی درمان‌های دندانی را افزایش دهند.

کلمات کلیدی: بیوفیلم، کلینیک دندانپزشکی، باکتری‌های مقاوم، *Staphylococcus xylosus*، *Bacillus safensis*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

گندزدایی و ضدعفونی کردن سطوح محیطی و ابزار آلوده در محیط‌های درمانی، چالشی مداوم و جنبه‌ای مهم در پیشگیری از عفونت و تأمین ایمنی بیماران است. عوامل عفونت‌زا، از طریق تماس مستقیم و غیرمستقیم، بلع، پوست و یا جذب مخاطی منتقل می‌شوند. نوع ارگانیسم و روش انتقال آن در محیط دندانپزشکی بسیار مهم است. از این نظر، عوامل عفونت‌زا به چند دسته منتقل‌شونده از راه تماس، منتقل‌شونده از راه قطرات، منتقل‌شونده از راه هوا و منتقل‌شونده از راه خون تقسیم می‌شوند. مطالعات نشان داده‌اند که سطوح محیطی، عاملی کلیدی در عفونت‌های متقاطع‌اند. عوامل عفونی که از راه سطوح آلوده منتقل می‌شوند، باید بتوانند بر روی این سطوح زنده بمانند. این عوامل می‌توانند از راه پوست سالم، مخاط یا چشم، بلع و در برخی شرایط

از راه استنشاق به میزبان جدید منتقل شوند. برآورد می‌شود که ۴۰-۲۰٪ عفونت‌های منتقل‌شونده در حین درمان، توسط کادر درمانی بعد از تماس با سایر بیماران یا سطوح محیطی آلوده منتقل شوند (۱). تجهیزات و سطوح موجود در یک مرکز دندانپزشکی به‌طور مداوم در معرض ذرات معلق آلوده به خون و بزاق بیماران هستند. بیشتر آلودگی این آئروسل‌ها از نوع کوکسی‌های گرم مثبت *استرپتوکوکوس ویریدانس* و *استافیلوکوک* می‌باشند (۲).

همچنین مطالعات، شیوع گسترده عفونت‌های تنفسی مرتبط با ذرات معلق در هوای محیط کار را در دندان‌پزشکان نشان داده‌اند. نتایج تحقیقات، پتانسیل انتقال عوامل عفونی از طریق استنشاق این ذرات معلق را تائید می‌کند (۳).

کلونیزه شدن و استقرار از ویژگی‌های مهم عوامل عفونی است. بنابراین، یافتن راه‌های مؤثر جهت پیشگیری از انتقال میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و ممانعت از استقرار این عوامل بیماری‌زا در محیط‌های درمان از اهمیت بسیاری برخوردار است (۴). بیوفیلم های میکروبی، به‌طور بالقوه منابع مهمی از آلودگی‌ها و عفونت‌های متقاطع در کلینیک‌های دندانپزشکی هستند. بیوفیلم ها در مجاری آب یونیت دندانپزشکی (Dental Unit Water Line)، لوله‌های مکش و اتصالات دستگاه، بیشترین پتانسیل خطر رادارند، زیرا ممکن است در طول درمان، در تماس با بیمار باشند. این خطر می‌تواند با گندزدایی منظم به‌وسیله مواد شیمیایی و سایر روش‌ها و به حداقل رساندن منابع آلودگی، همچنین جلوگیری از انتشار باکتری‌های بیماری‌زا از این مکان‌ها کاهش یابد. تجهیزات مهم‌ترین علت عفونت و آلودگی متقاطع در محیط‌های درمانی هستند. قسمت‌های خیس یا مرطوب تجهیزات پزشکی، برای استقرار و رشد بیوفیلم های میکروبی مناسب بوده و به‌طور ویژه‌ای با آلودگی و خطر عفونت همراه هستند. آب جمع شده در خارج از خطوط آب یونیت دندانپزشکی انباشته از میکروب‌ها است، شمار باکتری‌ها از چند هزارتا بیش از 10^6cfu/mL می‌باشد که می‌تواند منجر به استقرار بیوفیلم ها در خطوط آب شود. همچنین آب خروجی DUWL می‌تواند منبع عمده‌ای از اندوتوکسین باکتریایی باشد. اندوتوکسین استنشاق‌شده می‌تواند علائم مجاری هوایی تحریک‌پذیر را شدت بخشد و شدت آسم، به‌طور مستقیم با تجمع اندوتوکسین در ارتباط است (۵).

در کلینیک دندانپزشکی، خطر آلودگی برخی ابزار و تجهیزات بیشتر است. به علت زمان‌بر بودن فرآیند استریل کردن و محدودیت تعداد برخی از ابزار اصلی دندانپزشکی مانند انگل و توربین، این ابزار در فواصل زمانی بین دو بیمار اتوکلاو نمی‌شوند. به‌منظور گندزدایی این ابزار، از مواد ضدعفونی‌کننده قوی استفاده می‌شود، بدین ترتیب که ماده ضدعفونی‌کننده بر روی این ابزار اسپری شده و پس از تماس حداقل یک‌دقیقه‌ای با ماده گندزدا، این ابزار با استفاده از یک دستمال تمیز خشک می‌شوند. در این مرحله، دقت در گندزدایی بسیار حیاتی است. بعلاوه یونیت دندانپزشکی قابل استریلیزاسیون نبوده و بار میکروبی آن با فرآیندهای گندزدایی منظم کاهش می‌یابد. بااین‌حال بعضی از قسمت‌های یونیت بیشتر در معرض آلودگی هستند. به‌عنوان‌مثال چراغ یونیت می‌تواند در اثر پخش آئروسل‌ها و یا تماس با دستکش هنگام تنظیم نور چراغ آلوده شود. اگرچه دسته چراغ به‌وسیله فویل آلومینیومی یا پلاستیک پوشیده می‌شود، بااین‌حال احتمال آلودگی آن وجود دارد. علاوه بر این، سینی قرارگیری تجهیزات نیز می‌تواند در معرض آلودگی حاصل از آئروسل‌ها و یا تجهیزات آلوده باشد (۲).

الزام اخلاقی و کلینیکی برای کاهش خطر مواجه با میکروارگانیسم‌ها و جلوگیری از انتقال متقاطع عفونت در بین بیماران و نیز خود دندان‌پزشک و سایر کادر دندانپزشکی انجام تحقیقات را در بخش‌های مختلف دندانپزشکی ضروری می‌سازد. ازآنجاکه تنها باکتری‌های هوازی، بر روی سطوح اطراف، قادر به زنده ماندن و درنتیجه ایجاد بیماری هستند (۲)، هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری‌های هوازی آلوده‌کننده ابزار و سطوح کلینیکی یونیت، قبل و بعد از ضدعفونی کردن آن‌ها در فواصل بین بیماران و بررسی قدرت تشکیل بیوفیلم توسط آن‌هاست.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و جداسازی باکتری‌های مقاوم

نمونه‌گیری به‌صورت تصادفی دریکی از کلینیک‌های دندانپزشکی شهر اصفهان که واجد شش یونیت دندانپزشکی بود، انجام گرفت. بدین‌صورت که پس از اتمام کار دندان‌پزشک و قبل و بعد از ضدعفونی کردن دستگاه‌های انگل و توربین و نیز دسته چراغ یونیت و میز قرارگیری تجهیزات در فاصله زمانی معمول بین دو بیمار (حدود ۱۰ دقیقه)، با استفاده از سوآب استریل در ابعادی به طول و عرض ۲ سانتی‌متر و با دو تکرار نمونه‌گیری به عمل آمد.

سپس هر سوآب به لوله حاوی محیط TSB (Merck, Germany) منتقل شد (۶). بعلاوه، به‌منظور سنجش نوع آلودگی میکروبی هوای اتاق کار دندانپزشکی، از پلیت های ۹ سانتی‌متری حاوی محیط‌های بلاداگار (Merck, Germany) و نوترینت آگار(Merck, Germany) استفاده شد. این پلیت ها در فاصله ۱ متری از بیمار و به ارتفاع تقریباً ۱ متری از سطح زمین به مدت ۱ ساعت با درباز در اتاق کار دندانپزشکی قرار داده شدند (۷). نمونه‌ها به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل‌شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در شرایط هوازی گرما گذاری گردیدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، کلنی‌های رشد یافته بر روی پلیت های محتوی نمونه‌های هوا، به‌منظور خالص‌سازی به پلیت های ۹ سانتی‌متری حاوی محیط‌های کشت نوترینت آگار و مک کانگی آگار (Merck, Germany) منتقل شدند. همچنین نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از تجهیزات، از محیط کشت Broth (مایع) به محیط‌های جامد مانند مک کانگی آگار (جهت رشد باکتری‌های گرم منفی) و TSA (Merck, Germany) منتقل شدند. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرما گذاری گردیدند. کلنی‌ها بر اساس ویژگی‌های موفولوژیکی خالص‌سازی شدند.

شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌های جداسازی شده

برای تعیین نوع باکتری‌ها، از هر نوع کلنی لام رنگ‌آمیزی گرم تهیه شد تا باکتری‌ها از جهت گرم منفی یا مثبت بودن و کوکسی یا باسیل بودن افتراق یابند. پس‌ازآن، تست‌های تشخیصی اولیه مانند کاتالاز و نیز تست‌های اختصاصی بیوشیمیایی بر اساس واکنش‌های بیوشیمیایی فراهم‌شده توسط کتاب راهنمای عملی باکتری‌شناسی برجی انجام شد (۸).

بررسی تشکیل بیوفیلم در جدایه ها

پس از شناسایی، جدایه ها ازلحاظ تشکیل بیوفیلم موردبررسی قرار گرفتند تا جدایه هایی که توانایی بیشتری در تشکیل بیوفیلم دارند انتخاب شوند. این سنجش، با استفاده از روش میکروتیترپلیت انجام شد. بدین منظور، محیط کشت TSB حاوی ۰/۲۵٪ گلوکز (Merck, Germany) به‌عنوان محرک تشکیل بیوفیلم تهیه گردید. سپس سوسپانسیون میکروبی آماده شد. طبق استاندارد CLSI (2007) تعداد باکتری‌ها در یک سوسپانسیون باید برابر با $1/5 \times 10^8$ CFU/mL یعنی معادل با ۰/۵ مک فارلند باشد. برای تهیه این سوسپانسیون، از کشت شبانه باکتری‌ها در محیط کشت TSB حاوی گلوکز، یک یا چند قطره به محیط مایع استریل منتقل‌شده و برحسب نوع باکتری، به‌منظور ورود به فاز لگاریتمی، به مدت ۴-۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرما گذاری گردید (۹). سپس جذب سوسپانسیون در ۶۲۵ nm در حدود ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ تنظیم شد. با استفاده از محیط کشت استریل، این سوسپانسیون به نسبت ۱ به ۲۰۰ رقیق شد. به ازای هر باکتری ۳ چاهک در یک میکروتیترپلیت ۹۶ خانه‌ای (biofill) با ۲۰۰ µL از سوسپانسیون رقیق‌شده پر شد .سه چاهک حاوی TSB گلوکز دار استریل به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. میکروتیترپلیت مربوطه به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرما گذاری گردید (۱۰). بعد از گذشت زمان گرماگذاری، محیط کشت داخل چاهک‌ها تخلیه‌شده و چاهک‌ها سه بار با بافر فسفات سالین و یک‌بار با سرم فیزیولوژی استریل شستشو شدند. سپس به‌منظور تثبیت باکتری‌های چسبیده، به هر چاهک ۱۵۰ µL متانول (Merck, Germany) به مدت ۱۰ دقیقه افزوده شد. در گام بعد هر چاهک به مدت ۲۰ دقیقه با ۲۰۰ µL کریستال ویوله ۱٪ (Merck, Germany) مورد رنگ‌آمیزی قرار گرفت. سپس چاهک‌ها شسته شده و با ۱۵۰ µL اسید استیک ۳۳٪ به‌عنوان حلال پر شدند. در انتها جذب نوری هر چاهک در ۶۵۰nm با استفاده از دستگاه ELISA reader (Biotek-epoch) خوانده شد (۱۱). سپس OD نمونه‌ها با OD کنترل [$OD_{(C)}$] مقایسه و به‌صورت زیر گزارش شد (۱۲).

جدول ۱: رابطه میزان جذب و تشکیل بیوفیلم

عدم تشکیل بیوفیلم	$OD \leq OD(c)$
بیوفیلم ضعیف	$OD(c) \leq OD \leq 2\times OD(c)$
بیوفیلم متوسط	$2\times OD(c) < OD \leq 4\times OD(c)$
بیوفیلم قوی	$4 \times OD(c) < OD$

شناسایی مولکولی جدایه ها

جدایه هایی که بیوفیلم قوی‌تری تشکیل دادند، مورد شناسایی مولکولی قرار گرفتند. بدین منظور DNA ژنومی جدایه‌ها با استفاده از روش بافر کافت، استخراج شدند. برای ارزیابی کیفیت DNA استخراج‌شده از الکتروفورز توسط آگارز ۱ درصد (Merck, Germany) استفاده شد (۱۳).

به‌منظور شناسایی مولکولی جدایه ها، ژن *16S rRNA* تکثیر و توالی یابی شد. توالی *16S rRNA* باکتری‌های مختلف چند ناحیه محافظت‌شده دارد، این نواحی برای طراحی پرایمرهای universal

جهت تکثیر ژن *16S rRNA* مورداستفاده قرار می‌گیرد. توالی و مشخصات پرایمرهای universal مورداستفاده در جدول ۲ آورده شده است. با استفاده از این پرایمرها، PCR در مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری طبق پروتکل‌های موجود انجام شد (۱۳).

جدول۲: مشخصات پرایمر مورداستفاده درPCR

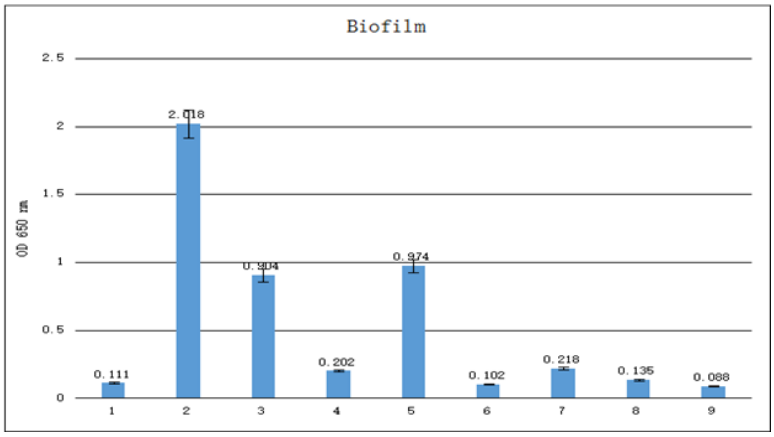
نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG

محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت فزا پژوه (fazabiotech, Iran) فرستاده شد. پس از ویرایش این توالی‌ها توسط نرم‌افزارBioedit ، برای مقایسه آن‌ها با توالی‌های DNA ریبوزومی سایر باکتری‌ها در دو بانک ژنتیکی NCBI و EZ Taxon) blast) شدند. جهت هم‌ردیف سازی این توالی‌ها از نرم‌افزار Clustal W (Novosibirsk, Russia) و برای رسم درخت فیلوژنتیکی از نرم‌افزار MEGA 5(Oxford, UK) استفاده شد. تمامی آزمایش‌های، با ۳ بار تکرار انجام شدند. کارهای آماری بر اساس آزمون Paired-Sample T-test در نرم‌افزار SPSS (New York, United States)بررسی و سطح معنی‌داری $p\leq 0/05$در نظر گرفته شد. به‌علاوه، از توانایی تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های استاندارد *Staphylococcus aureus*ATCC 25923 و Bacillus *subtillis* ATCC 6633 به‌عنوان کنترل استفاده گردید.

یافته‌ها

نمونه‌گیری و جداسازی باکتری‌های مقاوم

طبق یافته‌های این پژوهش، پس از ضدعفونی کردن ابزار موردبررسی در فواصل بین دو بیمار، برخی از باکتری‌ها از بین نرفته و زنده ماندند. این باکتری‌ها در نمونه‌های حاصل از هوای کلینیک نیز موجود بودند. پس از خالص‌سازی کلنی‌ها بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی، رنگ‌آمیزی گرم انجام شد.



نمودار ۱: مقایسه سویه‌های جداسازی شده ازنظر توانایی تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیترپلیت و رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله

جدول ۳: توانایی تشکیل بیوفیلم جدایه ها ($p< 0/05$) (ODکنترل، برابر با ۰/۰۸۸ می‌باشد که سایر چاهک‌ها با آن مقایسه شد.)

جدایه موردبررسی	میانگین OD	قدرت تشکیل بیوفیلم
استافیلوکوک شماره ۱	۰/۰۸۸ × ۲ < ۰/۱۱۱ < ۰/۰۸۸	ضعیف
استافیلوکوک شماره ۲	۲/۰۱۸ > ۰/۰۸۸ × ۴	قوی
استافیلوکوک شماره ۳	۰/۹۰۴ > ۰/۰۸۸ × ۴	قوی
باسیلوس شماره ۱	۰/۰۸۸ × ۴ > ۰/۲۰۲ > ۰/۰۸۸ × ۲	متوسط
باسیلوس شماره ۲	۰/۹۷۴ > ۰/۰۸۸ × ۴	قوی
باسیلوس شماره ۳	۰/۰۸۸ × ۲> ۰/۱۰۲ > ۰/۰۸۸	ضعیف
Staphylococcus aureus 25923	۰/۰۸۸ ×۴ > ۰/۲۱۸ > ۰/۰۸۸ × ۲	متوسط
Bacillus subtilis 6633	۰/۰۸۸ ×۲ > ۰/۱۳۵ > ۰/۰۸۸	ضعیف

شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌های جداسازی شده

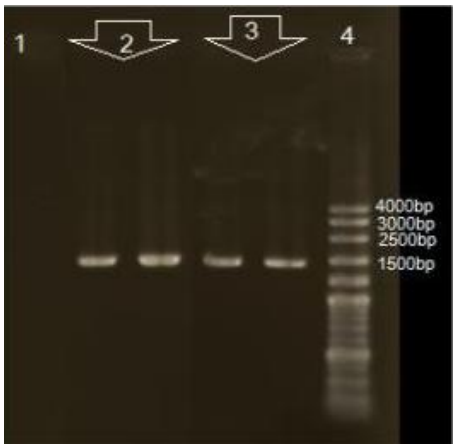
پس از رنگ‌آمیزی گرم، باکتری‌های کوکسی گرم مثبت خوشه‌ای و باسیل گرم مثبت اسپوردار مشاهده گردید. در این مطالعه هیچ باکتری گرم منفی دیده نشد. پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی بر اساس تست‌های بیوشیمیایی استاندارد ارائه‌شده در کتاب راهنمای عملی باکتری‌شناسی برجی، جدایه ها به دو جنس *استافیلوکوکوس* و *باسیلوس* تقسیم شدند.

بررسی تشکیل بیوفیلم در جدایه ها

جذب بیوفیلم های تشکیل‌شده توسط جدایه ها با دستگاه ELISA reader اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل در جدول ۲ آورده شده است. بر اساس یافته‌های حاصل از نتایج قدرت تشکیل بیوفیلم در پلیت میکروتیتر، دو جدایه استافیلوکوک شماره ۲ و باسیلوس شماره ۲ برای شناسایی مولکولی انتخاب گردیدند. ضمن آنکه بر طبق شناسایی بیوشیمیایی و مورفولوژیکی، جدایه استافیلوکوک شماره ۳، *Staphylococcus saprophyticus* می‌باشد.

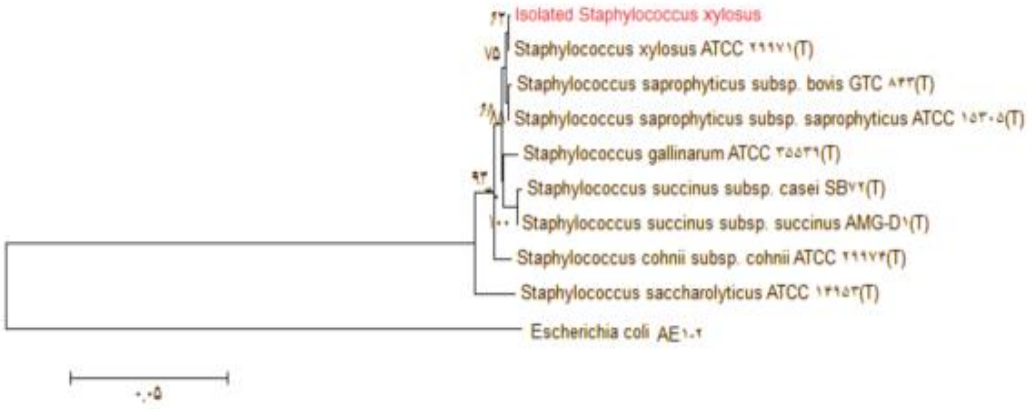
شناسایی مولکولی جدایه ها

پس از تکثیر ژن *16S rRNA* در واکنش PCR با استفاده از پرایمرuniversal ، قطعه‌ای به طول حدود ۱۵۰۰ جفت باز به دست آمد. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪، الکتروفورز و باند اختصاصی مشاهده گردید. نتایج حاصل از الکتروفورز در شکل ۱ قابل‌مشاهده است.

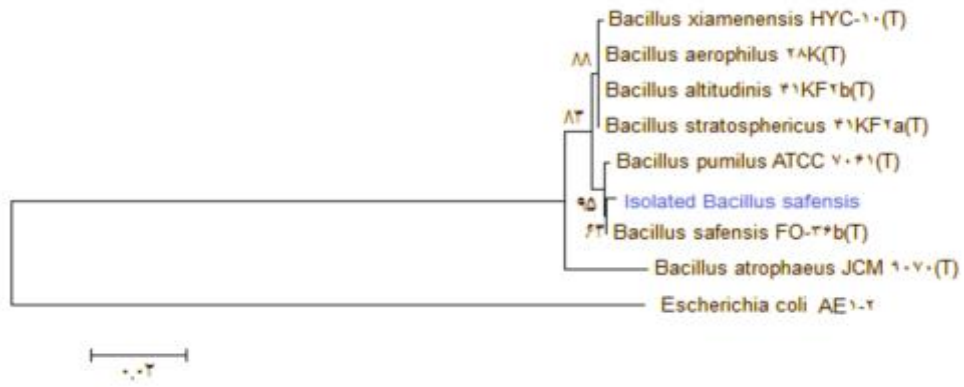


شکل ۱: تکثیر ژن *16SrRNA* بر روی ژل آگارز ۱ درصد. ۱- شاهد منفی.۲- نمونه *باسیلوس* شماره ۲. ۳- نمونه *استافیلوکوک* شماره ۲. ۴- شاخص وزن مولکولی 1500 plus

پس از انجام مراحل مولکولی، دو جدایه منتخب در حد گونه شناسایی شدند. استافیلوکوک موردبررسی، *S. xylosus* و باسیلوس موردبررسی، *B. safensis* می‌باشد. درخت فیلوژنتیکی مربوط به جدایه های منتخب، در نمودارهای ۲ و ۳ نشان داده‌شده است.



نمودار ۲: درخت فیلوژنتیکی مربوط به جدایه *Staphylococcus xylosus*



نمودار ۳- درخت فیلوژنتیکی مربوط به جدایه *Bacillus safensis*

بحث

کنترل انتقال عفونت‌ها در محیط کار دندانپزشکی به دلیل تماس مداوم با ترشحات آلوده دهانی و آغشته به خون بیماران، جزو اولویت‌های ویژه در مراکز خدمات بهداشتی و درمانی است. استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده می‌تواند با کنترل آلودگی‌های میکروبی محیط و کاهش استقرار میکروب‌ها، خطر انتقال بیماری‌های مسری را کاهش دهد. از مؤثرترین و شایع‌ترین راه‌های از بین بردن عوامل بیماری‌زا در محیط دندانپزشکی، استفاده از انواع مختلف محلول‌های شیمیایی ضدعفونی‌کننده است (۴). بنابراین جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های آلوده‌کننده محیط دندانپزشکی جهت اتخاذ اقدامات مؤثر از اهمیت زیادی برخوردار است. تاکنون مطالعاتی در این جهت انجام‌گرفته است. Azari و همکاران در طی مطالعات خود، توانستند از هوای برخی مکان‌های اتاق جراحی دندانپزشکی، گونه‌های استافیلوکوک فرصت‌طلب و *S. heamolyticus* و گونه‌های مقاوم *B. cereus* و *B. subtilis* را جداسازی و شناسایی کنند (۳).

در این پژوهش، با نمونه‌گیری از ابزار و هوای کلینیک دندانپزشکی، قبل و بعد از ضدعفونی کردن، گونه‌های باسیلوس و استافیلوکوک محیطی مقاوم جداسازی شدند. جنس‌های جداسازی شده در این پژوهش، با نتایج حاصل از مطالعات Azari و همکاران مطابقت دارد. این نتایج نشان می‌دهند که آئروسل‌ها و ذرات پراکنده از بیمار نقش بسزایی در آلودگی سطوح و ایجاد عفونت‌های متقاطع دارند.

Valian و همکاران آلودگی باکتریایی یونیت‌های دندانپزشکی را موردبررسی قراردادند. این گروه دریافتند که پس از اتمام پروسه درمان، در سطوح مختلف یونیت دندانپزشکی آلودگی میکروبی مشاهده می‌شود. باکتری‌های مشاهده‌شده شامل جنس‌های *Staphylococcus, Streptococcus* و *Bacillus* بوده‌اند (۲). نتایج حاصل، به‌نوعی یافته‌های حاصل از پژوهش پیش رو را تأیید می‌کند. مطالعه این گروه نشان می‌دهد که آلودگی پس از درمان یک بیمار افزایش قابل‌ملاحظه‌ای می‌یابد. بنابراین ضدعفونی نمودن سطوح در فواصل بین بیماران حائز اهمیت می‌باشد.

ملاک جداسازی و شناسایی باکتری‌ها در پژوهش پیش رو، قدرت تشکیل بیوفیلم در آن‌ها بوده است، زیرا باکتری‌های مقاوم با تشکیل بیوفیلم هتروژن و جذب باکتری‌های بیماری‌زا به این کمپلکس می‌توانند به‌طور بالقوه منبع مهمی از آلودگی بوده و موجب عفونت‌های متقاطع گردند. ازاین‌رو، دو گونه *S. xylosus* و *B. safensis* مهم‌ترین جدایه‌های یافت شده در این پژوهش هستند.

طبق پژوهش حاضر، *S. xylosus* پس از عمل گندزدایی تجهیزات، قادر به زنده ماندن بوده است. این باکتری، همه‌جایی است و می‌تواند در دامنه‌های محیطی متفاوتی یافت شود. همه‌جایی بودن آن می‌تواند با توانایی این باکتری در سازگار شدن با شرایط مختلف توجیه شود. از طرف دیگر یکی از ویژگی‌های آن، توانایی تشکیل بیوفیلم است (۱۴). Vela و همکاران، تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های *S. xylosus* جداسازی شده از بیوآئروسل های انبار مرغ گوشتی را در پلیت میکروتیتر بررسی کردند و متوجه شدند که ۸۶/۹٪ از سویه‌های جداسازی شده قادر به تشکیل بیوفیلم هستند و ۱۳/۷٪ آن‌ها بیوفیلم قوی تشکیل داده‌اند (۱۸). این نتیجه، با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت دارد.

S. xylosus جزو استافیلوکوک های کواگولاز منفی است. استافیلوکوک های کواگولاز منفی، ساکنان پوست، غدد پوستی و غشاهای مخاطی پستانداران و پرندگان مختلف می‌باشند (۸). استافیلوکوک های کواگولاز منفی، به دلیل افزایش روش‌های تهاجم و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، به مشکلی در بهداشت عمومی تبدیل‌شده‌اند. Azih و همکاران در سال ۲۰۱۳، در پژوهشی در نیجریه، در طول ۶ ماه به جمع‌آوری نمونه از بیماران بستری در بیمارستان پرداختند. در طی این تحقیق، *S. xylosus* تنها گونه استافیلوکوک گرم مثبت بود که از خون جداسازی شد. این نتیجه، قبلاً توسط Begum و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش‌شده بود (۱۵). همچنین طی تحقیقات Al-Mathkhury و همکاران در سال ۲۰۰۸، با نمونه‌گیری از بیماران دچار عفونت مجاری ادراری، سویه‌های *S. xylosus* جداسازی شد (۱۶). این نتایج، خطر بیماری‌زایی باکتری‌های محیطی در افراد دچار نقص ایمنی و اهمیت اجرای صحیح فرآیندهای گندزدایی را نشان می‌دهند.

باکتری دیگری که در این مطالعه جداسازی شد، *B. safensis* می‌باشد. این باکتری گرم مثبت، میله‌ای شکل، اسپورزا و مزوفیل است. حضور این‌گونه در خاک بیابان، غدد ریشه‌ای و ریزوسفر گزارش‌شده است (۱۷). مواردی از بیماری‌زایی این باکتری گزارش نشده است. بااین‌وجود، خطر تشکیل بیوفیلم هتروژن توسط این باکتری و عواقب ناشی از آن را باید مدنظر قرارداد.

در پژوهش پیش رو، همه جدایه ها قادر به تشکیل بیوفیلم بودند. وجود این باکتری‌های مقاوم و تشکیل بیوفیلم هتروژن توسط آن‌ها می‌تواند تهدیدی در کلینیک‌های دندانی باشد، زیرا می‌تواند بستری برای اتصال پاتوژن ها و استقرار آن‌ها در بیوفیلم گردد. همچنین با توجه به اینکه برخی از مراجعین به کلینیک‌های دندانپزشکی دچار نقص سیستم ایمنی هستند و نیز در مورد بیماران مبتلابه آندوکاردیت و افراد دارای پروتزهای مفصلی و ... حساسیت‌هایی وجود دارد، فراهم کردن محیطی امن و عاری از میکروب بسیار حائز اهمیت می‌باشد. ازاین‌رو آموزش کادر درمانی کلینیک‌های دندانپزشکی به‌منظور انجام درست فرآیندهای گندزدایی ضروری می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله، بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده می‌باشد که در دانشگاه الزهرا انجام گردید. بدین‌وسیله از اساتید محترم و مسئولین دانشکده علوم زیستی دانشگاه الزهرا تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Andrews N, Brandon-Kelsch N. Current dental surface disinfection protocols and a review of the new one minute surface disinfectants CaviCide1 and CaviWipes1. Inside Dent Assist. 2013; 9(3):46-47
2. Valian A, Shahbazi R, Farshidnia S, Tabatabaee F. Evaluation of the Bacterial Contamination of Dental Units in Restorative and Peridontics Departments of Dental School of ShahidBeheshti University of Medical Sciences. J Mash Dent Sch. 2014;37(4): 345-56. [In Persian]
3. Azari RM, Ghadjari A, MassoudiNejad MR, FaghihNasiree N. Airborne microbial contamination of dental units. Tanaffos. 2008;7(2):54-57.
4. Taheri J, BakianianVaziri P, Fallah F, NikKerdar N. Assessment of the efficacy of BIB forte in disinfection of dental instruments. J Dent Sch. 2010; 27 (4):179-186 [In Persian]
5. Ghosh S, Mallick SK. Microbial biofilm: contamination in dental chair unit. Ind Med Gaz. 2012; 145(10):383-387.
6. Motta RH, Ramacciato JC, Groppo FC, Pacheco Ade B, de Mattos-Filho TR. Environmental contamination before, during, and after dental treatment. Am J Dent. 2005;18(5):340-4.
7. Napoli C, Marcotrigiano V, Teresa Montagna M. Air sampling procedures to evaluate microbial contamination: a comparison between active and passive methods in operating theatres. BMC Public Health. 2012; 12:594.
8. Holt, J.G, Krieg, N.R. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed .Philadelphia: The Williams & Wilkins Co, Baltimore; 2009.
9. Kasra-Kermanshahi R, Kazemi MJ, Taherzadeh M. Laboratory exercises in microbiology with safety precaution and culture specific and fastidious bacteria. 1st ed. Yazd: Islamic Azad university; 1389. p.254-255. [In Persian]

10. Cassat JE, Lee CY, Smeltzer MS. Investigation of Biofilm Formation in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus.* Methods Mol Biol. 2007; 391:127–144.

11. Aminnezhad S, Kasra-Kermanshahi R. Antibiofilm activity of cell-free supernatant from *Lactobacillus casei* in *Pseudomonas aeruginosa*. KAUMS Journal(FEYZ). 2014; 18 (1):30-37. [In Persian]

12. Stepanoic S, Vukoic D, Dakic I, Branislava S, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods. 2000; 40(2):175-179.

13. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Oliver Glöckner F. Evaluation of general *16S ribosomal RNA* gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucl.Acids Res(NAR). 2013; 41(1): e1.

14. Dordet-Frisoni E, Dorchies G, De Araujo C, Talon R, Leroy S. Genomic diversity in *Staphylococcus xylosus*. Appl Environ Microbiol. 2007; 73(22):7199–7209.

15. Azih A, Enabulele I. Species distribution and virulence factors of coagulase negative *Staphylococci* isolated from clinical samples from the University of benin teaching hospital. JNSR. 2013; 3(9):38-43.

16. Al-Mathkhury HJF, Flaih MT, Al-Ghrairy Z KA. Pathological study on *Staphylococcus xylosus* isolated from patients with urinary tract infection. JNUS. 2008; 11(2):123-130.

17. Laborda PR, Fonseca FSA, Angolini CFF, Oliveira VM, Souza AP, Marsaioli AJ. Genome sequence of *Bacillus safensis* CFA06, isolated from biodegraded petroleum in Brazil. GenomeA. 2014; 2 (4).

18. Vela J, Hildebrandt K, Metcalfe A, Rempel H, BittmanSh, Topp E, et al. Characterization of *Staphylococcus xylosus* isolated from broiler chicken barn bioaerosol. PSJ. 2012; 91(12):3003-3012.

19. Jain K, Parida Sh, Mangwani N, R Dash H, Das S. Isolation and characterization of biofilm-forming bacteria and associated extracellular polymeric substances from oral cavity. Ann Microbiol. 2013; 63(4):1553-1562.