Original Article

Phenotypic evaluation of biofilm producing ability in Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

Moori-Bakhtiari N[1*], Moslemi M[2]

1- Department of Microbiology, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I. R. Iran.
2- Student of Veterinary Medicine School of Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz I. R. Iran.

Received April 18, 2016; Accepted November 21, 2016

Abstract:

Background: Like genomic changes, the ability for biofilm production is considered as one of the antibiotic resistant factors in bacteria which can cause recurrent infections. The infection resulted from Methicillin-resistant staphylococcus aureus is the most common form of such complications manifested as recurrent infections. The aim of this study was to investigate biofilm production ability among isolated Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in patients with different types of clinical infection.
Material and Methods: Fifty *Staphylococcus aureus* strains were isolated from different specimens and identified by biochemical and species-specific PCR tests. Methicillin-resistance specificity of isolates was confirmed by disk diffusion method and *mec*A gene presence; the biofilm- forming ability was evaluated by crystal violet microtiter plate assay and Congo red agar (CRA).
Results: Using turbidimetry with no acetic acid, the ability for biofim production was seen at 550 and 492 nm in 34 (68%) and 28 isolates (56%), respectively. In both methods, the most of isolates were weak biofilm producers. In CRA, 94% of isolates were biofilm producers which most (72.3%) of them were moderate producers.
Conclusions: While with the consideration of three studied methods high percentages of isolates were biofilm producers and despite the significant correlation seen between their results, there was a higher correlation coefficient between the results obtained from crystalviolet-treated microtiter plates with two reading methods.

Keywords: Methicillin-resistant *staphylococcus aureus*, Biofilm, Crystal violet microtiter plate, Congo red agar medium

*** Corresponding Author.**
Email: n.moori@scu.ac.ir
Tel: 0098 916 789 8807
Fax: 0098 613 333 0807

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2017; Vol. 20, No 6, Pages 525-531

Please cite this article as: Moori-Bakhtiari N, Moslemi M. Phenotypic evaluation of biofilm producing ability in Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. ***Feyz*** 2017; 20(6): 525-31.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-19]

ارزیابی فنوتیپی توانایی تولید بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین

نغمه موری بختیاری [۱*]، مریم مسلمی [۲]

خلاصه:

سابقه و هدف: تولید بیوفیلم همانند تغییرات ژنومی یکی از عوامل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها می‌باشد که عفونت‌های راجعه از پیامدهای آن و عفونت *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، معمول‌ترین شکل آن در افراد مبتلا به این عفونت‌ها می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی توانایی تولید بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از بیماران با عفونت‌های کلینیکی مختلف می‌باشد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۵۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های کلینیکی مختلف جداسازی شده و با تست‌های بیوشیمیایی و PCR اختصاصی گونه تعیین هویت شدند. با روش انتشار دیسک و بررسی حضور ژن *mecA*، مقاومت به متی‌سیلین در آن‌ها تایید و توانایی تولید بیوفیلم با دو روش میکروتیترپلیت کریستال ویوله و کشت در محیط قرمزکونگو ارزیابی شد.

نتایج: با روش کدورت سنجی در طول موج ۵۵۰ نانومتر و بدون اسیداستیک، در ۳۴ جدایه (۶۸ درصد) و با طول موج ۴۹۲، در ۲۸ جدایه (۵۶ درصد) توانایی تولید بیوفیلم مشاهده شد که در هر دو روش، اکثریت جدایه‌ها با قدرت ضعیف قادر به تولید بیوفیلم بودند. با انجام روش کشت در محیط قرمز کونگو، در ۹۴ درصد از جدایه‌ها که اغلب آن‌ها (۷۲/۳ درصد) قادر به تولید بیوفیلم با قدرت متوسط بودند، توانایی تولید بیوفیلم مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: با هر سه روش کار شده در این مطالعه درصد بالایی از جدایه‌های مورد مطالعه قادر به تولید بیوفیلم بودند و با وجود همبستگی معنی‌دار بین نتایج حاصل از هر سه روش، نتایج حاصل از میکروتیتر پلیت کریستال ویوله با دو روش خوانش از ضریب همبستگی بالاتری برخوردار بودند.

واژگان کلیدی : *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، بیوفیلم، میکروتیتر پلیت کریستالویوله، محیط قرمز کونگو آگاردار

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره بیستم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۵، صفحات ۵۳۱-۵۲۵

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) یکی از عوامل اصلی ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و عمومی می‌باشند. این باکتری‌ها اغلب توانایی ایجاد مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی را داشته و از این جهت می‌توانند باعث ایجاد اختلال در روند درمان گردند. مشابه سایر عفونت‌های استافیلوکوکی، عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین با افزایش احتمال شکست در درمان و ضرر و زیان اقتصادی همراه می‌باشند [۲،۱]. میزان واگیری و مرگ‌ومیر ناشی از عفونت‌های عمومی استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین همانند عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این باکتری، قابل توجه می‌باشد.

هم‌چنین، اهمیت عفونت‌های مرتبط با مواد و تجهیزات پزشکی مانند کاتترهای وریدی، مفاصل مصنوعی، ضربان‌ساز و دریچه‌های قلبی، لنزهای مصنوعی و شانت‌های مغزی و نخاعی که عمدتا توسط استافیلوکوک‌ها ایجاد می‌شوند، از روند روبه‌افزایشی برخوردار است. مهم‌ترین فاکتور در بیماری‌زایی عفونت‌های استافیلوکوکی مرتبط با مواد و تجهیزات پزشکی، تولید بیوفیلم باکتریایی چند لایه و چسبناک می‌باشد. بیوفیلم‌ها به‌عنوان اجتماع سازمان‌یافته‌ای از باکتری‌ها هستند که به سطوح می‌چسبند و شامل ترکیبات مختلفی مانند پلیمرهای خارج سلولی از اگزوپلی‌ساکاریدها، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها می‌باشند [۳]. تولید بیوفیلم می‌تواند توجیه مناسبی جهت منفی شدن نتایج کشت برخی نمونه‌های کلینیکی، علی‌رغم حضور عفونت باشد [۴]. تولید فزاینده این مواد در زمانی کوتاه باعث افزایش سایز تجمعی باکتری‌ها و درنهایت جلوگیری از کشتار باکتری‌ها توسط نوتروفیل‌ها می‌گردد [۵]. هم‌چنین، تولید بیوفیلم به‌عنوان یک مکانیسم کلیدی ممانعت از فعالیت آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در درمان عفونت‌های استافیلوکوکی کلینیکی می‌باشد [۶]. با ممانعت از ایمنی ذاتی و اختصاصی میزبان و هم‌چنین ایجاد مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک تولید بیوفیلم ممکن است با عود عفونت‌های استافیلو-

[۱] استادیار، گروه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۲] دانشجوی دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

* **نشانی نویسنده مسئول:**
اهواز، بلوار گلستان، دانشگاه شهید چمران، دانشکده دامپزشکی، بخش میکروب شناسی

تلفن: ۰۹۱۶۷۸۹۸۸۰۷ **دورنویس:** ۳۳۳۶۰۸۰۷ ۰۶۱

پست الکترونیک: n.moori@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۳۰ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۵/۹/۱

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-19]

کوکی بر اثر تداخل با ایمنی میزبان و روند درمانی همراه باشد. این شرایط موضعی باعث ماندگاری باکتری در بدن برای ماه‌ها یا سال‌ها با شیوع متناوب بروز حاد بیماری می‌گردد. فراوانی بروز چنین بیماری‌های عفونی در مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها (CDC) بررسی می‌گردد؛ براساس نتایج حاصل از بررسی این مرکز در سال ۲۰۰۶، ۶۵ درصد عوامل باکتریایی جداسازی شده از عفونت‌های انسانی قادر به تولید بیوفیلم هستند [۷]. اخیرا اطلاعات متعددی مرتبط با فاکتورهای موثر در تولید بیوفیلم در برخی از باکتری‌ها و نقش آنها در بیماری‌زایی باکتری و تنظیم بیان این فاکتورها ارایه شده است؛ از جمله در خصوص *استافیلوکوکوس اورئوس* که عنوان شده است در این باکتری تولید بیوفیلم با تاثیر بر بیان برخی ژن‌ها و تحت تاثیر قراردادن شرایط متابولیکی باکتری صورت می‌پذیرد [۸]. روش‌های آزمایشگاهی مختلفی جهت ارزیابی تولید بیوفیلم در باکتری‌ها وجود دارد. از جمله این روش-ها میکروتیترپلیت کریستال ویوله، تست لوله، کشت در محیط قرمز کونگو آگاردار و میکروسکوپ الکترونی (SEM) می‌باشد که متداول‌ترین آن‌ها روش میکروتیترپلیت کریستال ویوله عنوان شده است [۹]. بررسی آزمایشگاهی تولید بیوفیلم توسط باکتری‌ها می-تواند با انتخاب محیط کشت خاص تحت تاثیر قرار گیرد. شرایطی که باکتری در طی رشد با آن مواجه است می‌تواند تولید بیوفیلم را تاحد زیادی ترغیب یا سرکوب نموده و یا باعث ایجاد بیوفیلم با ساختاری غیرمعمول گردد [۱۰]. مطالعات متعددی درخصوص بررسی توانایی تولید بیوفیلم در گونه‌های مختلف از باکتری‌ها و هم‌چنین ارتباط آن با نوع محیط کشت باکتری و یا زمان و دمای رشد و هم‌چنین ارتباط این توانایی با عوامل حدت باکتری‌ها صورت گرفته است [۱۳-۱۱]. هدف از مطالعه حاضر بررسی توانایی تولید بیوفیلم در ۵۰ جدایه از *استافیلوکوکوس اورئوس*-های جداسازی شده از عفونت‌های کلینیکی انسانی (زخم، عفونت ادراری، مایع مغزی – نخاعی، و خون) و ارتباط آن با مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری‌ها بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری جدایه‌های باکتریایی

در مجموع ۳۵۰ نمونه کلینیکی شامل ترشحات زخم، ادرار، مایع مغزی– نخاعی و خون، از چندین بیمارستان سطح شهر اهواز جمع‌آوری شده و باروش‌های بیوشیمیایی متداول مانند رنگ‌آمیزی گرم، تست اکسیداز و کاتالاز و کشت در محیط افتراقی، *استافیلوکوکوس اورئوس* بودن عامل اولیه باکتریایی ۵۰ نمونه کلینیکی تائید گردید. جهت تعیین مقاومت به متی‌سیلین این جدایه‌ها، از روش استاندارد انتشار دیسک کربی‌باور استفاده شد و سپس بررسی حضور ژن *mecA* از طریق PCR تایید گردید [۱۴].

بررسی توانایی تولید بیوفیلم

جهت بررسی فنوتیپی توانایی تولید بیوفیلم جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین از دو روش میکرو-تیتر پلیت کریستال ویوله و کشت در محیط قرمزکونگو آگاردار استفاده گردید.

میکروتیتر پلیت کریستال ویوله

در این روش که با تغییر اندکی در روش انجام شده توسط Stepanovic و همکاران [۱۶،۱۵] صورت گرفت، ابتدا ۵۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در محیط آگار خون‌دار (حاوی ۷ درصد خون گوسفندی) کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد یک کلونی از هر پلیت انتخاب شده و در کنار شعله و تحت شرایط استریل به لوله حاوی محیط آبگوشت سویای تریپسینه (TSB) انتقال داده شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شب از این کشت برای هر جدایه به‌صورت مجزا کشت ۱/۱۰۰ در محیط پپتون‌واتر استریل تهیه شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مجددا انکوبه گردید تا کدورت آن با لوله شماره ۱ کدورت سنج مک‌فارلند برابر گردد. پس از گذشت ۳-۲ ساعت و ایجاد کدورت مورد نظر از هر لوله میزان ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری برداشته شده و در سه حفره مجاور هم از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته‌صاف پلی‌استرن ریخته شد و مجددا در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد برای مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. در این مطالعه از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) با روشی مشابه سایر جدایه‌ها به‌عنوان کنترل مثبت و از محیط کشت فاقد باکتری (کشت نشده) به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از طی شدن زمان انکوباسیون حفره‌های پلیت از سوسپانسیون باکتری تخلیه شده و تمامی حفرات با ۲۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد. پس از سه بار شستشو تا حد امکان حفرات پلیت خشک گردید و در هر حفره ۲۰۰ میکرولیتر متانول خالص اضافه شده و برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه گردید. سپس، متانول تخلیه شده و حفرات پلیت تا حد امکان خشک گردید. پس از مرحله فیکس‌کردن بیوفیلم تولیدی هر جدایه با متانول، با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر از محلول کریستال ویوله ۲ درصد به هر حفره و انکوباسیون برای مدت ۵ دقیقه در دمای محیط بیوفیلم تولید شده احتمالی توسط هر جدایه رنگ‌آمیزی شد.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-19]

پس از این زمان حفرات با آب مقطر شستشو داده شده و پلیت در دمای اتاق خشک گردید. جهت قرائت جذب نوری در هر حفره از طول موج ۵۵۰nm و دستگاه الایزا ریدر (دایناتک، ایسلند) استفاده شد. در مرحله بعد، پس از قرائت پلیت‌ها به هر حفره ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال اضافه شده و مجددا جذب نوری آنها در طول موج ۴۹۲nm قرائت گردید. در هر دو روش، میزان جذب نوری نهایی هر نمونه، میانگین جذب نوری هر سه حفره اختصاص یافته به یک نمونه در نظر گرفته شد. در نهایت جهت تفسیر نتایج میزان جذب نوری هر جدایه (oD_s) با میزان جذب نوری کنترل منفی (oD_{nc}) مقایسه شده و بر اساس طبقه‌بندی ارایه شده توسط Stepanovic و همکاران [۱۶]، جدایه‌ها از نظر تولید بیوفیلم در چهار گروه: فاقد توانایی بیوفیلم ($oD_s<oD_{nc}$)، تولید-کننده ضعیف بیوفیلم ($oD_{nc}<oD_S<2.oD_{nc}$)، تولید کننده بیوفیلم با شدت متوسط ($2oD_{nc}<oD_s<4oD_{nc}$) و تولید کننده قوی بیوفیلم ($4oD_{nc}< oD_S$) طبقه‌بندی شدند.

کشت در محیط قرمز کونگو آگاردار:

برای انجام این تست ابتدا جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در محیط قرمز کونگو آگاردار (CRA) به‌صورت خطی کشت داده شدند. این محیط که از اضافه کردن ۱۰۰ گرم گلوکز (مرک، آلمان) و ۰/۴ گرم رنگ قرمز کونگو (مرک، آلمان) به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر از محیط پایه آگار خون‌دار (های-مدیا، هند) تهیه شده بود پس از استریل شدن در پلیت، تقسیم و جهت کشت جدایه‌ها از آن استفاده گردید [۱۷]. پس از کشت، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید و پس از ۴۸-۲۴ ساعت جدایه‌های تولیدکننده کلونی سیاه رنگ به‌عنوان تولیدکننده بیوفیلم و سویه‌های تولید کننده کلونی قرمز رنگ به‌عنوان جدایه‌های فاقد توانایی تولید بیوفیلم در نظر گرفته شدند [۱۱].

آنالیز آماری

در این تحقیق میزان همبستگی نتایج تولید بیوفیلم در روش میکروتیتر پلیت کریستال ویوله با دو روش خوانش (در طول موج ۵۵۰ و ۴۹۲ نانومتر)، با یکدیگر و هم‌چنین با نتایج کشت در محیط قرمز کونگو آگاردار با آزمون اسپیرمن مقایسه شد.

نتایج

نتایج تولید بیوفیلم در جدایه‌های مورد مطالعه با سه روش مختلف در جدول شماره ۱ آورده شده است. با بررسی و مقایسه نتایج حاصل از قرائت جذب نوری با روش میکروتیتر پلیت کریستال ویوله در طول موج ۵۰۰ nm (فاقد اسید استیک) و طول موج ۴۹۲ nm (واجد اسید استیک) مشخص گردید که با استفاده از اسید استیک ۵۶ درصد (۲۸ سویه) جدایه‌ها از توانایی تولید بیوفیلم برخوردار می‌باشند؛ درصورتی‌که در حالت عدم استفاده از اسید استیک در ۶۸ درصد (۳۴ سویه) از جدایه‌ها توانایی تولید بیوفیلم مشاهده گردید. از ۲۸ نمونه مثبت شده با قرائت جذب نوری در طول موج ۴۹۲ nm، ۴ جدایه (۱۴/۳ درصد) با توانایی متوسط تولید بیوفیلم و ۲۴ جدایه (۸۵/۷ درصد) با توانایی ضعیف تولید بیوفیلم تشخیص داده شدند. درحالی‌که در طول موج ۵۵۰ nm از ۳۴ نمونه مثبت شده، ۵ جدایه (۱۴/۷ درصد) با توانایی متوسط تولید بیوفیلم و ۲۸ جدایه (۸۵/۷ درصد) با توانایی ضعیف تولید بیوفیلم و ۱ جدایه (۲/۹ درصد) تولید کننده قوی تشخیص داده شدند. با بررسی و مقایسه جذب نوری قرائت شده هر نمونه در دو طول موج مشخص شد که نتایج حاصل از این دو روش در ۴۱ جدایه (۸۲ درصد) هم‌خوانی داشته و در ۹ جدایه (۱۸درصد) فاقد هم خوانی می‌باشد. جدایه‌های مورد بررسی براساس رنگ کلونی ایجاد شده در محیط قرمز کونگو آگاردار (از قرمز روشن تا بنفش تیره) پس از ۴۸ ساعت در ۴ گروه قرار داده شدند. با بررسی نتایج حاصل از کشت در این محیط ۳ جدایه (۶ درصد) از مجموع ۵۰ جدایه مورد مطالعه فاقد توانایی تولید بیوفیلم تشخیص داده شدند. و از مجموع ۴۷ جدایه مثبت شده از نظر تولید بیوفیلم ۳ جدایه (۶/۴ درصد) با تولید کلونی‌های بنفش تیره توانایی تولید بیوفیلم را به‌طور قوی نشان دادند. هم‌چنین، ۳۴ جدایه (۷۲/۳ درصد) با توانایی متوسط در تولید بیوفیلم و ۱۰ جدایه (۲۱/۳ درصد) با توانایی ضعیف در تولید بیوفیلم ارزیابی شدند. نتایج حاصل از بررسی تولید بیوفیلم ۵۰ جدایه استافیلوکوکوس در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. با آزمون اسپیرمن همبستگی بین نتایج حاصل از دو روش میکروتیترپلیت و خوانش در طول موج ۵۵۰ و ۴۹۲ نانومتر با ضریب همبستگی برابر با ۰/۸۲۰ معنی‌دار گزارش شد. با این آزمون، هم-چنین همبستگی بین روش‌های میکروتیتر پلیت و خوانش در طول موج ۵۵۰ نانومتر و کشت در حیط قرمز کونگو با ضریب همبستگی ۰/۷۱۹ معنی‌دار بود ($P<$۰/۰۰۱).

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-19]

جدول شماره ۱- نتایج مربوط به تولید بیوفیلم ۵۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه به تفکیک روش ارزیابی

سویه‌های مورد مطالعه	روش‌های ارزیابی		
	میکروتیتر با طول موج ۵۵۰	میکروتیتر با طول موج ۴۹۲	کشت در محیط قرمز کونگو
سویه ۱	۱	۱	۲
سویه ۲	۱	۱	۲
سویه ۳	۱	۱	۲
سویه ۴	۲	۲	۴
سویه ۵	۱	۱	۲
سویه ۶	۲	۲	۳
سویه ۷	۲	۱	۳
سویه ۸	۲	۲	۳
سویه ۹	۲	۲	۴
سویه ۱۰	۱	۱	۲
سویه ۱۱	۱	۱	۲
سویه ۱۲	۱	۱	۲
سویه ۱۳	۲	۲	۳
سویه ۱۴	۲	۲	۳
سویه ۱۵	۲	۲	۳
سویه ۱۶	۱	۱	۱
سویه ۱۷	۲	۲	۳
سویه ۱۸	۳	۲	۳
سویه ۱۹	۲	۲	۳
سویه ۲۰	۲	۱	۳
سویه ۲۱	۲	۱	۴
سویه ۲۲	۱	۱	۲
سویه ۲۳	۲	۱	۳
سویه ۲۴	۱	۱	۳
سویه ۲۵	۲	۱	۳
کنترل مثبت	۴	۴	۴

سویه‌های مورد مطالعه	روش‌های مختلف ارزیابی		
	میکروتیتر با طول موج ۵۵۰	میکروتیتر با طول موج ۴۹۲	کشت در محیط قرمز کونگو
سویه ۲۶	۳	۲	۳
سویه ۲۷	۲	۲	۳
سویه ۲۸	۲	۱	۳
سویه ۲۹	۴	۳	۴
سویه ۳۰	۲	۲	۴
سویه ۳۱	۱	۱	۱
سویه ۳۲	۲	۲	۴
سویه ۳۳	۱	۱	۳
سویه ۳۴	۲	۲	۳
سویه ۳۵	۳	۳	۳
سویه ۳۶	۳	۳	۳
سویه ۳۷	۳	۳	۳
سویه ۳۸	۱	۱	۱
سویه ۳۹	۲	۲	۳
سویه ۴۰	۱	۱	۳
سویه ۴۱	۲	۲	۳
سویه ۴۲	۲	۲	۳
سویه ۴۳	۲	۲	۳
سویه ۴۴	۲	۲	۳
سویه ۴۵	۲	۲	۳
سویه ۴۶	۱	۱	۲
سویه ۴۷	۲	۲	۳
سویه ۴۸	۲	۲	۳
سویه ۴۹	۲	۲	۳
سویه ۵۰	۱	۱	۲
کنترل مثبت	۴	۴	۴

در این جدول عدد ۱ نشانه عدم توانایی در تولید بیوفیلم و عدد ۴ بیشترین توانایی در تولید بیوفیلم می‌باشد.

جدول شماره ۲- نتایج تولید بیوفیلم در ۵۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* با سه روش مطالعه

شدت تولید بیوفیلم / روش بررسی	قوی تعداد (درصد از موارد مثبت)	متوسط تعداد (درصد از موارد مثبت)	ضعیف تعداد (درصد از موارد مثبت)	عدم تولید تعداد (درصد از کل موارد)
۵۵۰ نانومتر و فاقد اسیداستیک	(۲/۹)۱	(۱۴/۷)۵	(۸۲/۴)۲۸	(۳۲)۱۶
۴۹۲ نانومتر و دارای اسیداستیک	۰	(۱۴/۳)۴	(۸۵/۷)۲۴	(۴۴)۲۲
کشت در محیط قرمز کونگو	(۶/۴)۳	(۷۲/۳)۳۴	(۲۱/۳)۱۰	(۶)۳

بحث

باکتری‌های تولیدکننده بیوفیلم قادر به تولید طیف وسیعی از عفونت‌ها در انسان می‌باشند. میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری‌ها ۵۰۰ تا ۵۰۰۰ برابر بیشتر از مقاومت آنتی‌بیوتیکی در زمان عدم تولید بیوفیلم در این باکتری‌ها می‌باشد [۱۸]. از دلایل ایجاد مقاومت در باکتری‌های تولید کننده بیوفیلم ایجاد حجم زیادی از پلی‌ساکاریدهای خارجی، بیان ژن‌های اختصاصی مقاومت و هم‌چنین ایجاد شرایط مناسب جهت رشد آهسته باکتری‌ها عنوان شده است [۱۹]. علاوه بر آن، تولید بیوفیلم باعث ماندگاری باکتری در بدن و ایجاد عفونت مزمن خواهد شد و در

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-19]

نتیجه تعداد حاملین باکتری افزایش خواهد یافت؛ در این خصوص MRSAهای تولید کننده بیوفیلم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند [۱۲،۲۰،۲۱]. در مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری بین محل جداسازی باکتری (زخم، ادرار، مایع مغزی-نخاعی و خون) و تولید یا عدم تولید بیوفیلم مشاهده نگردید. در مطالعه صورت گرفته توسط Wang و همکاران (۲۰۱۲) در چین شیوع MRSA های تولید کننده بیوفیلم ۶۶ درصد گزارش شده است [۲۲]. هم‌چنین، در مطالعه صورت گرفته توسط Molina و همکاران تمامی سویه‌های MRSA جدا شده از کشت خون با توانایی تولید بیوفیلم گزارش شدند [۲۰]. براساس نتایج حاصل از یک تحقیق صورت گرفته در آفریقای جنوبی ۳۷/۸ درصد از MRSAهای جداسازی شده توانایی بالایی در تولید بیوفیلم از خود نشان داده‌اند [۱۳]. درصد باکتری‌های تولید کننده بیوفیلم در مطالعه حاضر با مطالعات پیشین هم‌خوانی دارد، اما درصد باکتری‌های تولید کننده بیوفیلم با توانایی بالا در مطالعه حاضر کمتر از مطالعات قبلی می‌باشد که این تفاوت می‌تواند ناشی از متفاوت بودن شرایط کشت و سویه باکتری در این مطالعات باشد. هم‌چنین، در مطالعه حاضر با بررسی نتایج حاصل از تست میکروپلیت با قرائت جذب نوری در دو طول موج ۵۵۰ و ۴۹۲ nm مشخص شد که در طول موج ۵۵۰ nm تعداد موارد مثبت (۷۰ درصد) بیشتری نسبت به طول موج ۴۹۲ nm (۶۰ درصد) وجود دارد، اما با روش کشت در محیط قرمز کونگو آگاردار ۹۴ درصد از نمونه‌ها مثبت تشخیص داده شدند که بیشتر آنها تولید کننده متوسط بیوفیلم (۶۸ درصد) بودند، درصورتی‌که در روش میکروپلیت اغلب (۸۵ درصد) به‌صورت تولید کننده ضعیف بیوفیلم مشاهده شدند. در مطالعه رضایی و همکاران روش میکروتیتر پلیت کریستال ویوله به‌عنوان روشی دقیق‌تر و حساس‌تر از روش کشت در محیط قرمز کونگو ارزیابی گردیده است [۱۷]. در مطالعه حاضر روش کشت در محیط قرمز کونگو تعداد موارد مثبت بیشتری را نسبت به روش میکروتیترپلیت کریستال ویوله نشان داد که این تفاوت و افزایش چشم‌گیر در نتایج حاصل از کشت در محیط قرمز کونگو می‌تواند ناشی از تاثیرپذیری نتایج این روش از شرایط رشد باکتری و یا خطای دید درنظر گرفته شود. هم‌چنین، اثر ممانعتی برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله ماکرولیدها و جنتامایسین بر تولید بیوفیلم در باکتری‌ها گزارش شده است [۲۰]. در مطالعه حاضر تمامی ۵۰ جدایه MRSA به پنی‌سیلین، متی‌سیلین و آمپی‌سیلین مقاومت نشان دادند و ۳۴ درصد از جدایه‌ها به سیپروفلوکساسین، کلیندا-مایسین و جنتامایسین حساس بودند و تمامی این جدایه‌های حساس از جدایه‌های تولید کننده بیوفیلم بودند. در برخی مطالعات اثر ممانعتی سیپروفلوکساسین بر اتصال و تولید بیوفیلم در باکتری‌ها بیش از ۶۰ درصد گزارش شده است [۱۹].

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر درصد تولید بیوفیلم در سویه‌های MRSA جداسازی شده از نمونه‌های کلینیکی انسانی نسبتاً بالا می‌باشد (۹۴-۶۰ درصد). با توجه به اینکه توانایی تولید بیوفیلم باعث افزایش مقاومت باکتری در برابر آنتی‌بیوتیک‌های متداول می‌گردد و هم‌چنین با در نظر گرفتن احتمال بالای انتقال این عوامل از فردی به فرد دیگر در بیمارستان‌ها و مراکز عمومی می‌تواند به‌عنوان زنگ خطری برای بهداشت عمومی درنظرگرفته شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران به‌دلیل تامین هزینه این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

[1] Lora-Tamayo J, Murillo O, Iribarren JA, Soriano A, Sánchez-Somolinos M, Baraia-Etxaburu JM, et al. A large multicenter study of methicillin-susceptible and methicillin-resistant Staphylococcus aureus prosthetic joint infections managed with implant retention. ***Clin Infect Dis*** 2013; 56(2): 182–94.

[2] Salgado CD, Dash S, Cantey JR, Marculescu CE. Higher risk of failure of methicillin-resistant Staphylococcus aureus prosthetic joint infections. ***Clin Orthop Relat Res*** 2007; 461: 48–53.

[3] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. ***Science*** 1999; 284(5418): 1318–22.

[4] Swan A, Amer H, Dieppe P. The value of synovial fluid assays in the diagnosis of joint disease: a literature survey. ***Ann Rheum Dis*** 2002; 61(6): 493–8.

[5] Simon GL, Miller HG, Borenstein DG. Synovial fluid inhibits killing of Staphylococcus aureus by neutrophils. ***Infect Immun*** 1983; 40(30): 1004–10.

[6] Dastgheyb S, Parvizi J, Shapiro IM, Hickok NJ, Otto1 M. Effect of Biofilms on Recalcitrance of Staphylococcal Joint Infection to Antibiotic Treatment. ***J Infectious Dis*** 2015; 211(4): 641–50

[7] Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. ***Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*** 2004; 12(3): 185–90.

[8] Mack D, Beckerb P, Chatterjeec I, Dobinskya S, Knoblocha JKM, Petersb G, et al. Mechanisms of

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-19]

biofilm formation in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. ***Int J Med Microbiol*** 2004; 294(2): 203–12.
[9] Kawamura H, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Miyanohara H, Hashiguchi T, et al. Quantitative analysis of biofilm formation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains from patients with orthopaedic device-related infections. ***FEMS Immunol Med Microbiol*** 2011; 63(1): 10-5.
[10] Joo HS, Otto M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. ***Chem Biol*** 2012; 19(12): 1503–13.
[11] Atshan SS, Shamsudin MN, Lung LT, Sekawi Z, Ghaznavi-Rad E, Pei CP. Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. ***J Biomed Biotechnol*** 2012; 2012: 417247.
[12] Sasirekha B, Usha MS, Amruta AJ, Ankit S. Evaluation and Comparison of Different Phenotypic Tests to Detect Methicillin Resistant Staphylococcus aureus and their Biofilm Production. ***Int J Pharm Tech Res*** 2012; 4(2): 532-541.
[13] Samie A, Shivambu N. Biofilm production and antibiotic susceptibility profiles of Staphylococcus aureus isolated from HIV and AIDS patients in the Limpopo Province, South Africa. ***Afr J Biotechnol*** 2011; 10(65): 14625-36.
[14] Moori Bakhtiari N, Jamshidian J, Khalafi E. Effect of *Juglans regia* Li. Stem Bark Hydroalcoholic Extract on Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. ***Jundishapur J Nat Pharm Prod*** 2016; 11(1): e29095.
[15] Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. ***J Microbiol Methods*** 2000; 40(2): 175–9.
[16] Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for for assessment of biofilm production by staphylococci. ***APMIS*** 2007; 115(8): 891–9.
[17] Rezaei M, Moniri R, Mousavi SGA, Jabari Shiade M. Prevalence of Biofilm Formation Among Methicillin Resistance Staphylococcus aureus Isolated From Nasal Carriers. ***Jundishapur J Microbiol***; 6(6): e9601.
[18] El-Shekh NA, Ayoub AM, El-Hendawy HH, Abada EA, Khalifa SY. In vitro Activity of some Antimicrobial Agents against Intact and Disrupted Biofilms of Staphylococci in the Indwelling Vascular Catheter Patients. ***World Appl Sci J*** 2010; 10(1): 108-20.
[19] El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella HA, Abd El-Baky RM, Gad GF. Effect of ciprofloxacin and N-acetylcysteine on bacterial adherence and biofilm formation on ureteral stent surfaces. ***Pol J Microbiol*** 2009; 58(3): 261-7.
[20] Molina A, Del Campo R, Maiz L, Morosini MI, Lamas A, Baquero F, et al. High prevalence in cystic fibrosis patients of multiresistant hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST228-SCCmecI capable of biofilm formation. ***J Antimicrob Chemother*** 2008; 62(5): 961-7.
[21] O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Robinson DA, et al. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in Staphylococcus aureus isolates from device-related infections. ***J Clin Microbiol*** 2007; 45(5): 1379-88.
[22] Wang L, Yu F, Yang L, Li Q, Zeng XZ, Xu Y. Prevalence of virulence genes and biofilm formation among Staphylococcus aureus clinical isolates associated with lower respiratory infection. ***Afr J Microbiol Res*** 2010; 4(23): 2566-9.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-19]