

## شناسایی مولکولی ژن‌های *icaA*، *icaB*، *icaC* و *icaD* در جدایه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

فاطمه صغرا مهدوی، رابعه ایزدی  
آملی<sup>۱</sup>، رقیه اسکویبان

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی  
واحد آیت اله آملی، آمل، مازندران،  
ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۲/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۲

### چکیده

**سابقه و هدف:** استافیلوکوک طلایی یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های بیمارستانی با میزان مرگ و میر بالا است. عفونت استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین وابسته به بیوفیلم، یک نگرانی بزرگ بالینی در این دسته از بیماران همچنان باقی مانده است. هدف از انجام این تحقیق، بررسی ژن‌های اپرون *icaABCD* در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین تشکیل دهنده بیوفیلم بود.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه، بر روی ۲۳۸ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های بالینی مختلف بیماران مراجعه کننده به بیمارستان شهدای محمود آباد از استان مازندران در سال ۱۳۹۶ انجام شد. آزمون حساسیت به متی‌سیلین با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار با توجه به دستورالعمل‌های موسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی انجام شد. تمام جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، برای تشکیل فنوتیپی بیوفیلم و تعیین ژن‌های *icaABCD* با استفاده از روش آگار قرمز کنگو (Congo red agar) و روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** در این بررسی، ۳۳ جدایه (۱۳/۸٪)، توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند که ۸ جدایه (۲۴/۲۴٪)، ۱۹ جدایه (۵۷/۵۷٪) و ۶ جدایه (۱۸/۱۹٪) به ترتیب توانایی قوی، متوسط و ضعیف را نشان دادند. فراوانی ژن‌های *icaA*، *icaB*، *icaC* و *icaD* به ترتیب ۸٪، ۹٪، ۱۰٪ و ۲۰٪ بود.

**نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نشان داد، جدایه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند و هر چهار ژن *icaA*، *icaB*، *icaC*، *icaD* در این جدایه‌ها مشاهده شد.

**کلمات کلیدی:** استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، ژن‌های *icaABCD*، بیوفیلم

### \*نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد  
اسلامی واحد آیت اله آملی،  
آمل، مازندران، ایران

۰۹۱۱ - ۳۰۰۴۸۲۶

E-mail: rabi\_izadiamoli@yahoo.com

## مقدمه

برای تشکیل بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپی‌رمیدیس* دارا می‌باشند. این پلی ساکارید پلیمری از واحدهای گلیکوز-آمینوگلیکان با اتصال بتا او ۶ (۸۰ تا ۸۵٪)، بخش کوچک تر گلیکوز آمینیل های غیر استیله آبیونی حاوی فسفات و سوکسینات -استر (۲۰ تا ۲۵٪) می‌باشد و توسط آنزیم ان - استیل گلوکز آمینیل ترانسفراز سنتز می‌شود. بیان این آنزیم توسط لوکوس *icaA* انجام می‌شود. مشارکت *icaD* با این لوکوس، موجب افزایش سنتز پلی ساکارید و ایجاد فنوتیپ کپسولی می‌گردد. نقش ژن *icaB* -د استیله کردن پلی ساکارید قبل از اتصال به غشای سلولی بوده و ژن *icaC* یک پروتئین غشایی را کد می‌کند که به طویل سازی و ترشح این پلی ساکارید از سلول کمک می‌کند.<sup>۱،۲</sup> هدف از انجام این مطالعه، بررسی فراوانی ژن های تشکیل دهنده بیوفیلم در جدایه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین جدا شده از نمونه‌های بالینی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه بطور مقطعی بر روی ۲۳۸ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* از ۳۵۰ نمونه بالینی مختلف شامل سوختگی، زخم، ترشحات ریه، ادرار، خون، کاتتر، چشم و پوست در سال ۱۳۹۶ در بیمارستان شهدای محمود آباد از استان مازندران انجام شد.

برای تعیین جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی اگزاسیلین ۱ میکروگرمی (خریداری شده از شرکت Mast انگلستان) و سفوکسیتین ۳۰ میکروگرمی (پادتن طب، ایران) با روش استاندارد کربی- بوئر انجام گرفت. تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* بر اساس استانداردهای CLSI انجام شد. پس از تهیه سوسپانسیون نیم مک فارلند از هر یک از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، با وارد کردن سوآپ استریل به لوله حاوی سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند چند بار داخل آن چرخانده و بعد از فشار دادن به جداره، سوآپ را روی سطح مولر هیتون آگار کشیده شد (کشت چمنی) و پس از ۱۵ دقیقه با استفاده از پنس استریل دیسک‌های آنتی‌بیوتیک بر روی پلیت‌ها قرار داده شد و سپس پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت

*استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین یکی از عوامل اصلی ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و عمومی می‌باشند. این باکتری ها اغلب توانایی ایجاد مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی را داشته و از این جهت می‌توانند باعث ایجاد اختلال در روند درمان گردند.<sup>۱،۲</sup> مشابه سایر عفونت‌های *استافیلوکوکوس*، عفونت های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین با افزایش احتمال شکست در درمان، ضرر و زیان اقتصادی همراه می‌باشند. مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* به متی سیلین به علت حضور ژن *mec* می‌باشد. ژن *mecA* بین لوکوس ژن‌های کدکننده پروتئین *(spa)* A و ژن کد کننده پروتئین مسئول در بیوسنتز پورین‌ها (*purA*) قرار دارد و پروتئینی به نام PBP2a (PBP2') با وزن مولکولی ۷۸ کیلو دالتون را کد می‌کند.<sup>۳،۴</sup> میزان واگیری و مرگ و میر ناشی از عفونت های عمومی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین همانند عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این باکتری، قابل توجه می‌باشد. مهم‌ترین فاکتور در بیماری‌زایی عفونت‌های *استافیلوکوکوس* مرتبط با مواد و تجهیزات پزشکی، تولید بیوفیلم باکتریایی چند لایه و چسبناک می‌باشد. تولید بیوفیلم می‌تواند توجیه مناسبی جهت منفی شدن نتایج کشت برخی نمونه های کلینیکی، علیرغم حضور عفونت باشد.<sup>۵،۶</sup> در حقیقت بیوفیلم *استافیلوکوکوس*، گروهی از میکروارگانیسم‌ها می‌باشند که با شبکه‌ای از کانال‌های داخلی در ماتریکس گلیکو پروتئینی و پلی ساکاریدی خارج سلولی به نام ماده پلیمری خارج سلولی در ارتباط هستند. ماده پلیمری خارج سلولی از پلی ساکارید، پروتئین، فسفولیپید، اسید تیکوویک و دیگر مواد پلیمریک هیدراته با ۸۵ تا ۹۵ درصد آب تشکیل شده است و از این طریق می‌توانند باعث چسبیده شدن انواع عوامل بیماری‌زا در روی سطح داخلی کارته‌ها و سطوح تجهیزات صنایع غذایی شده که این روند باعث انتقال انواع میکروب‌های بیماری‌زا می‌گردد. در *استافیلوکوکوس اورئوس*، تشکیل بیوفیلم مستلزم مجموعه ژن‌های (*ica ABCD*) است که با رمزگذاری آنزیم‌های دخیل در سنتز پلی ساکاریدهای چسبنده داخل سلولی صورت می‌گیرد.<sup>۷،۸</sup> لوکوس *ica* از ژن‌های *icaA icaB icaC icaD* و *icaD* تشکیل شده است. از میان ژن‌های لوکوس *ica*، *icaA* و *icaD* نقش بیشتری را

میزان ۱۴ میکرولیتر ( PCR buffer, MgCl<sub>2</sub> dNTP, Taq polymerase)، پرایمرهای فوروارد و ریورز هر کدام ۱ میکرولیتر، DNA استخراج شده ۱ میکرولیتر و آب مقطر ۸ میکرولیتر مخلوط شده و توسط دستگاه Bio-Rad PCR واکنش انجام شد. چرخه دمایی شامل واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، بدنال آن ۳۳ سیکل در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۵ درجه سلسیوس برای ژن *icaA* مدت ۶۰ ثانیه، ۵۹ درجه سلسیوس برای ژن *icaB* و *icaC* مدت ۶۰ ثانیه، و ۵۶ درجه سلسیوس برای ژن *icaD* به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و یک سیکل نهایی برای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. برای مشاهده نتیجه تکثیر هر یک از ژن های مورد مطالعه، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ در بافر  $\times$  TBE 10 انجام شد<sup>۱۳،۱۴</sup>.

### یافته‌ها

در این پژوهش تعداد ۲۳۸ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* از ۳۵۰ نمونه بالینی جداسازی شد. فراوانی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در هر یک از نمونه‌های بالینی، سوختگی ۹۳ جدایه (۳۹/۵٪)، زخم ۲۸ جدایه (۱۲/۵٪)، ترشحات ریه ۱۶ جدایه (۶٪)، کشت ادرار ۲۶ جدایه (۱۱٪)، کشت خون ۱۱ جدایه (۴٪)، کاتتر ۱۲ جدایه (۵٪)، چشم ۱۶ جدایه (۶٪) و پوست ۳۶ جدایه (۱۵٪) بود.

انکوبه شد. پس از آن با استفاده از خط کش قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر اندازه گرفته شد، با استفاده از جدول CLSI، میزان حساسیت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک ها بصورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش گردید. از سویه‌های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC25923 و ATCC43300 (MRSA) تهیه شده از گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران) به عنوان سویه های کنترل در تست استفاده شد<sup>۱۱</sup>.

از محیط کنگو رد آگار (Congo red agar) برای بررسی تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد. نمونه‌های تهیه شده بعد از کشت روی محیط بلاد آگار و انجام تست‌های بیوشیمیایی، تعیین گونه شدند و نمونه‌هایی که *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند، روی محیط جامد کنگو رد برای تشکیل بیوفیلم کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. در بررسی جدایه‌ها، کلنی‌های سیاه رنگ به عنوان جدایه‌های تشکیل دهنده قوی بیوفیلم، کلنی‌های تقریباً قرمز سیاه جدایه‌های تشکیل دهنده بیوفیلم ضعیف و کلنی‌های رنگ قرمز روشن بعنوان جدایه‌های فاقد توانایی تولید بیوفیلم شناسایی شدند<sup>۱۲</sup>.

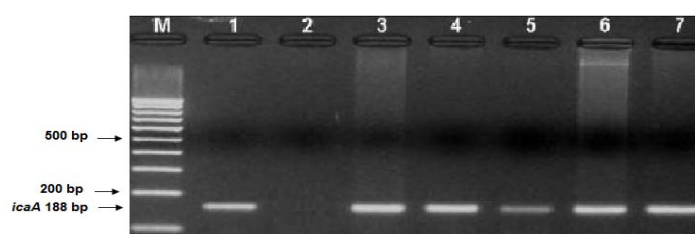
برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، ابتدا استخراج DNA با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت کیاژن ( Qiagen RNeasy Plus Mini Kit) انجام شد. شناسایی ژن‌های *icaABCD* با روش PCR از پرایمرهای ارائه شده در جدول ۱<sup>۶</sup> انجام پذیرفت. برای انجام واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل مستر میکس به

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن های *icaABCD*

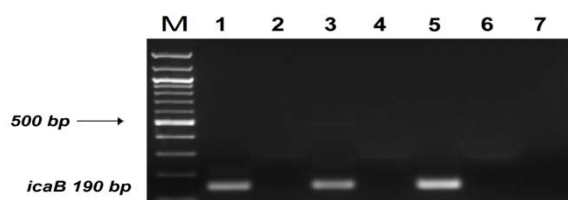
نام ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول
<i>icaA</i>	<i>icaA</i> -F; ACACTTGCTGGCGCAGTCAA <i>icaA</i> -R; TCTGGAACCAACATCCAACA	۱۸۸bp
<i>icaB</i>	<i>icaB</i> -F; TCCTTATGGCTTGATGAATGACG <i>icaB</i> -R; CTAATCTTTTTTCATGGAATCCGTCC	۱۹۰bp
<i>icaC</i>	<i>icaC</i> -F; ATGGGTTATAACTACGAACGTG <i>icaC</i> -R; CGTGCAAATACCCAAGATAAC	۱۹۲bp
<i>icaD</i>	<i>icaD</i> -F; ATGGTCAAGCCCAGACAGAG <i>icaD</i> -R; AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA	۱۹۸bp

داشتند که به ترتیب ۸ (۲۴/۲۴٪)، ۱۹ (۵۷/۵۷٪) و ۶ جدایه (۱۸/۱۹٪) بیوفیلم را بصورت قوی، متوسط و ضعیف نشان دادند، در حالی که ۵۴ (۶۲٪) جدایه‌ها، قادر به تشکیل بیوفیلم نبودند. فراوانی حضور ژن های *icaA*، *icaB*، *icaC* و *icaD* در ۸۷ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین به ترتیب حضور ژن *icaD* در ۱۷ جدایه (۲۰٪) (شکل ۱)، ژن *icaC* در ۹ جدایه (۱۰٪) (شکل ۲)، ژن *icaB* در ۸ جدایه (۹٪) (شکل ۳) و ژن *icaA* در ۷ جدایه (۸٪) (شکل ۴) باشد.

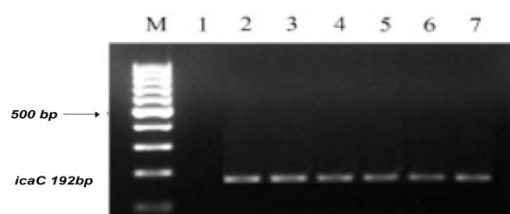
براساس نمودار ۱، بیشترین فراوانی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مربوط به نمونه‌های سوختگی با تعداد ۹۳ (۳۹٪)، پوست ۳۶ (۱۵٪) و زخم (۱۲٪) بود در حالی که کمترین جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مربوط به کشت خون ۱۱ (۴٪) بود. از ۲۳۸ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شده تعداد ۸۷ جدایه (۳۶/۵۵٪) مقاوم به متی سیلین با روش دیسک دیفیوژن شناسایی شد. از این تعداد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، از نظر تشکیل بیوفیلم با استفاده از کشت بر روی محیط کونگو رد آگار نشان دادند که ۳۳ جدایه (۳۸٪) توانایی تشکیل بیوفیلم را



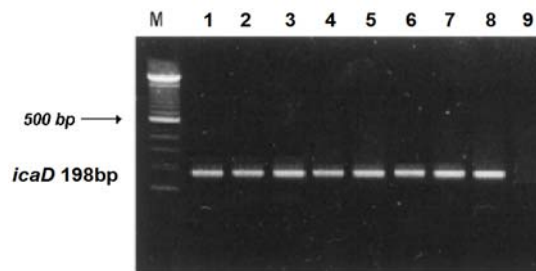
شکل ۱: نتایج واکنش PCR برای حضور ژن *icaA* (۱۸۸ bp) در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین. ردیف M، مارکر bp ۱۰۰، ردیف ۱، کنترل مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923)، ردیف ۲، کنترل منفی، ردیف ۳ تا ۷ نمونه‌های بالینی مثبت برای حضور *icaA* (۱۸۸ bp)



شکل ۲: نتایج واکنش PCR برای حضور ژن *icaB* (۱۹۰ bp) در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین. ردیف M، مارکر bp ۱۰۰، ردیف ۱، کنترل مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923)، ردیف ۲، کنترل منفی، ردیف ۳ و ۵ نمونه‌های بالینی مثبت و ردیف ۴، ۶ و ۷ نمونه‌های بالینی منفی برای حضور ژن *icaB*



شکل ۳: نتایج زنجیره‌ای PCR برای حضور ژن *icaC* (۱۹۲ bp) در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین. ردیف M، مارکر bp ۱۰۰، ردیف ۱، کنترل مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923)، ردیف ۲، کنترل منفی، ردیف ۳ تا ۷ نمونه‌های بالینی مثبت برای حضور ژن *icaC*



شکل ۴: نتایج واکنش PCR برای حضور ژن *icaD* (۱۹۸ bp) در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین. ردیف M، مارکر bp ۱۰۰، ردیف ۱، کنترل منفی، ردیف ۲، کنترل مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC25923)، ردیف ۳ تا ۱۰ نمونه‌های بالینی مثبت برای حضور ژن *icaC* و ردیف ۱۱ نمونه بالینی منفی

جدایه (۸٪) بود. در مطالعه حاضر، ۳۳٪ از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، توانایی تشکیل بیوفیلم داشتند در حالی که در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۰ که توسط ووانگ و همکاران در آلمان انجام شد، ۷۸٪ از جدایه‌های عفونی *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه به عنوان نمونه‌های مولد بیوفیلم گزارش شدند که نتایج آنها با مطالعه حاضر مطابقت نداشته است. همچنین در مطالعه ووانگ و همکاران، ۷۳/۵٪ از جدایه‌ها توانایی تولید قوی بیوفیلم، ۵/۳۳٪ توانایی تولید متوسط بیوفیلم و ۱۵/۴٪ از جدایه‌ها توانایی تولید ضعیف بیوفیلم از خود نشان دادند در حالی که در مطالعه ما، ۲۴/۲۴٪، ۵۷/۵۷٪ و ۱۸/۱۹٪ توانایی تولید بیوفیلم را بصورت قوی، متوسط و ضعیف نشان دادند. در مطالعه ووانگ و همکاران، فراوانی حضور ژن *icaC*، ۶۷/۵٪ و ژن *icaB* ۶۳/۲٪ برآورد گردید<sup>۱۷</sup>، در حالی که در مطالعه حاضر، فراوانی ژن *icaC* ۱۰٪ و ژن *icaB* ۹٪ مشاهده شد. تفاوت در نتایج، می‌تواند به نوع جدایه‌های مورد بررسی مربوط باشد که در مطالعه ما، فقط جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین مورد بررسی قرار گرفت. در برخی مطالعات انجام شده نظیر بررسی که در سال ۲۰۱۱، توسط افتخار و همکاران بر روی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام گرفت و از این میان، ۷۳٪ از جدایه‌های عفونی مورد مطالعه واجد ژن *icaB* و *icaA* بودند<sup>۱۸</sup>، در حالی که در مطالعه حاضر، فراوانی ژن *icaB* و *icaA* به ترتیب ۸٪ و ۹٪ بود. هم چنین در مطالعه‌ای که توسط نامور و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام گردید، از ۶۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* تمامی نمونه‌ها دارای ژن

## بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاوم به متی‌سیلین بودند، همچنین جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین، توانایی تشکیل بیوفیلم داشته و دارای ژن‌های *icaA* *icaB* *icaC* و *icaD* بودند. *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، یکی از شایع‌ترین باکتری‌های دارای مقاومت به چندین آنتی‌بیوتیک می‌باشد که قادر به کلونیزه شدن و بقا در محیط‌های بیمارستانی است. *استافیلوکوکوس اورئوس* این توانایی را از طریق کسب ژن‌های مناسب از ارگانیسم‌های مختلف در محیط کسب می‌کند<sup>۱۵</sup>. تشکیل بیوفیلم، حساسیت به درمان‌های ضد میکروبی را کاهش می‌دهد که نهایتاً هزینه‌های درمانی بالایی برای بیماران به دنبال خواهد داشت. تولید بیوفیلم، ناشی از فعالیت اپرونی تحت عنوان *icaABCD* می‌باشد<sup>۱۶</sup>. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد، از ۳۵۰ نمونه بالینی، ۲۳۸ جدایه با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی بعنوان جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (۶۸٪) شناسایی شد. از ۲۳۸ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شده، تعداد ۸۷ جدایه (۳۶/۵۵٪) مقاوم به متی‌سیلین با روش دیسک دیفیوژن بودند. جدایه‌ها از نظر تشکیل بیوفیلم بر روی محیط کونگو رد آگار، ۳۳ جدایه (۳۸٪) توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند، ۵۴ (۶۲٪) جدایه قادر به تشکیل بیوفیلم نبودند. فراوانی حضور ژن‌های *icaB* *icaA* *icaC* و *icaD* در ۸۷ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین به ترتیب حضور ژن *icaD* در ۱۷ جدایه (۲۰٪)، ژن *icaC* در ۹ جدایه (۱۰٪)، ژن *icaB* در ۸ جدایه (۹٪) و ژن *icaA* در ۷

های مختلف وجود دارد و همه جدایه‌هایی که در شرایط آزمایشگاهی قادر به تشکیل بیوفیلم بوده اند، اپرون ica را داشتند. دلایل تفاوت نتایج مطالعه ما با سایر مطالعات انجام شده می‌تواند به دلیل تعداد نمونه مورد بررسی، نوع جدایه مورد بررسی (مقاوم به متی سیلین)، منطقه جغرافیایی، شرایط میزبان و ژنتیک جدایه‌ها باشد.

با توجه به اهمیت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین به عنوان یک پاتوژن بیمارستانی و با توجه به افزایش روز افزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های بالینی، به منظور پیشگیری از تشکیل بیوفیلم و کلونیزه شدن باکتری در ابزار و محیط بیمارستان، رعایت استریلیزاسیون مناسب در ابزارهای درمانی مرتبط با بیمار، جهت جلوگیری از انتقال عفونت و هم چنین تشکیل بیوفیلم توصیه می‌گردد. در مطالعه حاضر، تولید بیوفیلم در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* MRSA جداسازی شده از نمونه‌های کلینیکی انسانی مشاهده شد. 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 به عنوان زنگ خطری برای بهداشت عمومی در نظر گرفته شود.

*icaC* بودند<sup>۱۹</sup> در حالی که در مطالعه ما، تنها ۹ جدایه از ۸۷ جدایه واجد ژن *icaC* بودند. بر طبق یافته‌های کاوامورا و همکاران، حتی محل آناتومیک و محیط فیزیولوژیکی که از آن نمونه‌ها جدا شده است ممکن است در تشکیل بیوفیلم تأثیرگذار باشد، بطوری که فراوانی اپرون *ica* در جدایه‌های جدا شده از کیسه ملتحمه، ۶۰٪ و در جدایه‌های جدا شده از پوست، ۱۵٪ گزارش شده است<sup>۲۰</sup>، در حالی که در مطالعه حاضر، فراوانی ژن‌های *ica* در سوختگی ۱۳٪، پوست ۹٪ و خون ۵٪ بوده است. در مطالعه مارتین و همکاران (۲۰۰۲) فراوانی ژن *icaB* ۸۹٪ گزارش شده است<sup>۲۱</sup> در حالی که در مطالعه ما، ۹٪ بوده است. همچنین در مطالعه آتسان هر چهار ژن *ica* در تمام جدایه‌های مقاوم به متی سیلین یافت شدند<sup>۱۴</sup>. نتایج آنها با مطالعه حاضر مطابقت نداشته است. مارسوز و همکاران، مطالعه‌ای ارتباط ژن‌های *icaA* و *icaD* با تشکیل بیوفیلم را بررسی کردند، از بین ۳۰۲ جدایه مقاوم به متی سیلین، ۲۵۷ جدایه (۹۷٪) ژن *icaD* را داشتند و ۲۷ جدایه (۹٪) این ژن را نشان ندادند<sup>۲۲</sup>. نتایج این مطالعه همانند مطالعه حاضر نشان داد که همه جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین واجد ژن‌های *ica* نیستند. همچنین ژن *icaA* در تمامی جدایه‌های *icaD* منفی، مثبت شد. این یافته، با مطالعه حاضر مطابقت داشته است. نتایج نشان می‌دهد ارتباط بسیار کمی بین میزان شیوع ژن‌های *ica* در جدایه

## References

- Price LB, Stegger M, Hasman H, Aziz M, Larsen J, Andersen PS, et al. Staphylococcus aureus CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. *MBio*. 2012;3(1):e00305-11.
- Feng J, Michalik S, Varming AN, Andersen JH, Albrecht D, Jelsbak L, et al. Trapping and proteomic identification of cellular substrates of the ClpP protease in Staphylococcus aureus. *Journal of proteome research* 2013;12(2):547-58.
- Fridkin SK, Hageman JC, Morrison M, Sanza LT, Como-Sabetti K, Jernigan JA, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus disease in three communities. *New England Journal of Medicine* 2005;352(14):1436-44.
- Mekni MA, Bouchami O, Achour W, Ben Hassen A. Strong biofilm production but not adhesion virulence factors can discriminate between invasive and commensal Staphylococcus epidermidis strains. *Apmis*. 2012;120(8):605-11.
- Mediavilla JR, Chen L, Mathema B, Kreiswirth BN. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA). *Current opinion in microbiology* 2012;15(5):588-95.
- Mirzaee M, Najar Peerayeh S, Ghasemian A-M. Detection of *icaABCD* genes and biofilm formation in clinical isolates of methicillin resistant Staphylococcus aureus. *Iranian Journal of Pathology* 2014;9(4):257-262.
- Mottola C, Matias CS, Mendes JJ, Melo-Cristino J, Tavares L, Cavaco-Silva P, et al. Susceptibility patterns of Staphylococcus aureus biofilms in diabetic foot infections. *BMC microbiology* 2016;16(1):119.
- Vanzieleghem T. Staphylococcus epidermidis biofilms: new insights in their formation and development of control strategies: UCL-Université Catholique de Louvain; 2015.

9. Abbasi S, Zamanzad B. Detection of icaABCD Genes in Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Patients in Iran. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases* 2015;3(3):67-70.
10. Mirzaee M, Najar-Peerayeh S, Behmanesh M, Forouzandeh Moghadam M, Ghasemian A-M. Biofilm formation and presence of ica genes in *Staphylococcus aureus* isolated from intensive care unit. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2014;24(115):43-51.
11. Ray P, Manchanda V, Bajaj J, Chitnis D, Gautam V, Goswami P, et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in India: Prevalence & susceptibility pattern. *The Indian journal of medical research* 2013;137(2):363.
12. Kaiser TDL, Pereira EM, dos Santos KRN, Maciel ELN, Schuenck RP, Nunes APF. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2013;75(3):235-9.
13. Mirzaee M, Najar-Peerayeh S, Behmanesh M, Forouzandeh-Moghadam M, Ghasemian A-M. Detection of Intracellular Adhesion (ica) Gene and Biofilm Formation *Staphylococcus aureus* isolates from Clinical Blood Cultures. *Journal of Medical Bacteriology* 2015;3(1-2):1-7.
14. Atshan SS, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Lung LTT, 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;2012:976972. doi: 10.1155/2012/976972.
15. Fabres-Klein MH, Santos MJC, Klein RC, de Souza GN, Ribon AdOB. An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. *BMC veterinary research* 2015;3(1)11.
16. Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Campanile F, Amicosante G, Perilli M, et al. Presence of the ica operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clinical Microbiology and Infection* 2004;10(12):1081-1088.
17. 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. *African Journal of Microbiology Research* 2010;4(23):2566-2569.
18. Eftekhari F, Dadaei T. Biofilm formation and detection of icaAB genes in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2011;14(2):132-6.
19. Ziebuhr W, Heilmann C, Götz F, Meyer P, Wilms K, Straube E, et al. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infection and immunity* 1997;65(3):890-6.
20. Kawamura H, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Miyanojima 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 Immunology & Medical Microbiology* 2011;63(1):10-5.
21. Martín-López JV, Pérez-Roth E, Claverie-Martín F, Gil OD, Batista N, Morales M, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* clinical isolates harboring the ica gene cluster needed for biofilm establishment. *Journal of clinical microbiology* 2002;40(4):1569-70.
22. Grinholc M, Wegrzyn G, Kurlenda J. Evaluation of biofilm production and prevalence of the icaD gene in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with nosocomial infections and carriers. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2007;50(3):375-9.

Fatemeh Soghra Mahdavi,  
Rabieh Izadi Amoli\*, Roghaye  
Oskoeian

Department of Microbiology,  
Ayatollah Amoli Branch,  
Islamic Azad University,  
Amol, Iran

## Molecular Identification of *icaA*, *icaB*, *icaC* and *icaD* Genes in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates Resistant to Methicillin

Received: 3 May 2018 ; Accepted: 3 Mar 2019

### Abstract

**Background & Objectives:** *Staphylococcus aureus* is one of the most common nosocomial pathogens with high mortality rates. The Biofilm-dependent methicillin-resistant *S. aureus* remains a major clinical concern in this group of patients. The aim of this study was to investigate the *icaABCD* forming biofilm genes in methicillin resistant isolates of *S. aureus*.

**Materials and Methods:** In study was performed on 238 *S. aureus* isolates from various clinical specimens obtained from patients referring to Shohada hospital, Mahmudabad in 1396. Susceptibility test to methicillin was performed by disk diffusion agar according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines. All Methicillin-resistant *S. aureus* isolates were examined for phenotype biofilm formation and determination the *icaABCD* genes by using Congo red agar and PCR method.

**Results:** The ability for biofilm formation in 33 (38%) methicillin-resistant isolates of *S. aureus* was showed strong 8 isolates (24.24%) as strong, 19 isolates (57.57%) as average and 6 isolates (18.19%) as weak. The prevalence of *icaA*, *icaB*, *icaC*, and *icaD* were 8%, 9%, 10% and 20% respectively.

**Conclusion:** Our results indicated that the isolates of methicillin-resistant *S. aureus* were able to form biofilms and all four *icaABCD* genes were identified in these isolates.

**Keywords:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *icaABCD* genes, Biofilm

\*Corresponding Author:  
Department of Microbiology,  
Ayatollah Amoli Branch,  
Islamic Azad University,  
Amol, Iran

Tel: 0911-3004826  
E-mail: rabi\_izadiamoli@yahoo.com