بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، بیوفیلم و اشکال L استافیلو کوک های کواگولاز مثبت و منفی جدا شده از نمونه های بالینی با روش E-test و ELISA

کیومرث امینی[1]، بهروز شجاعی سعدی*[2]، احسان استبرقی [3]

[1] دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه ، ایران.
[2] مربی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.
[3] عضو هیات علمی، گروه دامپزشکی، واحد شهربابک، دانشگاه آزاد اسلامی، شهربابک، ایران

تاریخ دریافت مقاله:۹۹/۱/۲٤ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۵/۱۲

چکیده

زمینه و هدف ها: باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از خانواده میکروکوکاسه، گرم مثبت و کاتالاز مثبت که هم دارای متابولیسم اکسیداتیو و هم متابولیسم تخمیری می‌باشد. استافیلوکوک ها گروه بزرگی از ساکنین پوست، غشاء مخاطی پستانداران هستند. در برخی از این باکتری‌ها، لایه پپتیدوگیلکان کاملاً از بین رفته و در برخی نیز هنوز بخش‌های کوچکی از آن باقی است. هدف از این پژوهش بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، بیوفیلم و اشکال L استافیلوکوک‌های کواگولاز مثبت و منفی جدا شده از نمونه های بالینی با روش E-test و ELISA ضروری بنظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها: تعداد ٤٣٧ نمونه بالینی که از بیمارستان مهر آیین تهران و سایر مراکزدرمانی در طول ٦ ماه جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها ابتدا در محیط بلاد آگار و سپس از کلنی‌ها بر روی محیط‌های اختصاصی جهت تشخیص نهایی انتقال داده شد. رشد باکتری ها در محیط چهارگانه نیز BHI Agar، BHI broth، LMP Agar و LPM broth مورد بررسی قرار گرفت. سنجش بیوفیلم با جذب نوری و استفاده از پلیت چاهک انجام شد. در آزمون E.TEST مقاومت آنتی بیوتیکی همچون تست کربی – بائر، از محیط مولر هینتون آگار استفاده شد.

یافته‌ها: بیشترین مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیکی به ترتیب مربوط به پنی سیلین و جنتامایسین، آمیکاسین است. نتایج آزمایش E-TEST بر اساس قطر هاله بیشترین مقاومت مربوط به اریترومایسین با ۱ میلی متر و بیشترین حساسیت مربوط به سیپروفلوکساسین با ۲ میلی متر بود.

نتیجه گیری: نتایج آزمایش تعیین MIC بر روی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده با روش ماکرودایلوشن در پنی سیلین مقاومت بیشتری را نسبت به سیپروفلوکساسین نشان داد. درنتیجه اشکال L، پروتوپلاست‌ها و اسفروپلاست‌ها باکتریائی، بدلیل فقدان پپتیدوگلیکان، در مقابل آنتی‌بیوتیکهای ممانعت کننده ازسنتز پپتیدوگلیکان نظیر انواع پنی سیلینها، سفالوسپورینها و آنتی‌بیوتیکهای گلیکوپپتیدی (ونکومایسین و تیکوپلانین) مقاوم هستند.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، آنتی بیوگرام، الایزا، بیوفیلم

نویسنده مسئول:
مربی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک- ایران

۰۹۱۸۳۶۳۹۷۳۲
E-mail.: shojaee_sadi@yahoo.com

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-21]

[DOI: 10.29252/aums.10.3.317]

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس از خانواده میکروکوکاسه و این خانواده شامل جنس‌های دیگری مانند میکروکوکوس و پلانوکوکوس نیز می‌باشد. جنس استافیلوکوک دارای بیش از ۲۷ گونه و ۷ تحت گونه است و شایع ترین گونه آن که اغلب عامل بیماری استافیلوکوکی می‌باشد، بنام استافیلوکوک طلایی است[۱]. استافیلوکوک گروه بزرگی از باکتری‌ها در پوست و غشای مخاطی پستانداران هستند. این باکتری ها روی سطح پوست سر و صورت بصورت میکروکلونی بوده، مجرای خروجی گوش، بخش قدامی سوراخ‌های بینی، نواحی مرطوب و چین‌دار پوست، محل‌های مناسب استقرار استافیلوکوکها هستند. سوراخهای بینی و ناحیه پرینه از عمده ترین مراکز استقرار استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیس می‌باشد. استافیلوکوکوس اورئوس، مهمترین عامل بیماریزایی انسان محسوب می گردد که سویه های مولد کوآگولاز را استافیلوکوکوس اُورئوس در نظر گرفته و دارای فعالیت آنزیمی و توکسینی وسیعی می‌باشدکه برخلاف دیگر استافیلوکوک ها قند مانیتول را تخمیر کرده و همولیز کامل دارد [۲]. استافیلوکوک‌ها گروهی از پروتئینهای سطح سلولی را دارند که به عنوان ادهزین عمل می‌کنند و به پروتئینهای ماتریکس خارج سلولی مثل: فیبرونکتین، ویترونکتین، فیبرینوژن، لامینین، سیالوپروتئین های استخوان، ترومبوسپاندین، الاستین، کلاژن های نوع I،II،IV متصل می‌شوند. در برخی از این باکتری‌ها، لایه پپتیدوگلیکان کاملاً از بین رفته و در برخی نیز هنوز بخش‌های کوچکی از آن باقی مانده است. اشکال L، در باکتریهای گرم منفی و یا گرم مثبتی وجود دارد که علیرغم فقدان لایه پپتیدوگلیکان، قادر به رشد و تکثیر هستند ولی برای حفظ بقای خود نیاز به محیط غذایی با فشار اسمزی زیاد (کمی بیش از فشار اسمزی درونی باکتری) دارند. ساکارز و کلرید سدیم از مهمترین حفاظت کننده های اسمزی برای اشکال L به شمار می آیند. در صورت ایجاد شرایط محیطی مناسب، اشکال L قادر به بازگشت به شکل دیواره دارشان هستند. اشکال L در محیط مایع غالباً به اشکال مدور و یا کمی بیضوی مشاهده می شوند ولی در محیط کشت جامد، شکل منظم نداشته و معمولاً به صورت سلولهایی بزرگ با سیتوپلاسم دانه دار می باشند[۳]. بیوفیلم در استافیلوکوکها از ترکیبات خارج سلولی است که به مقادیر متنوعی در همه آنها تولید می شود. بیوفیلم‌ها رابطه تنگاتنگی با عوامل ژنتیکی، گونه، شرایط رشد دارند. مهمترین سویه‌های استافیلوکوکی تولیدکننده بیوفیلم: استافیلوکوک اپیدرمیدیس، استافیلوکوک کاپیتیس زیر گونه اوره کاپیتیس، استافیلوکوک کاپیتیس زیر گونه کاپیتیس، استافیلوکوک هومینیس، استافیلوکوک همولیتیکوس، استافیلوکوک وارنری می‌باشد[۵]. موفقیت در درمان عفونت های باکتریایی به ایجاد تراکم موثر ماده آنتی باکتریال در محل عفونت بستگی دارد. چنین تراکمی بایستی موجب کشته شدن یا توقف رشد باکتری شده و در عین حال تعادل بین باکتری و میزبان را به نفع میزبان سوق دهد و نیز در پلاسما، مایعات و بافت های بدن میزبان، تراکم دارو بایستی از حد سمی برای سلول های بدن انسان کمتر باشد [۶]. مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیکی در استافیلوکوکوس اورئوس بر روی آنتی بیوتیک‌های مختلف متفاوت بوده و هر دسته دارویی مکانیسم مقاومت مخصوص به خود را دارد [۷]. اوّلین مورد MRSA در اواسط دهۀ ۷۰ میلادی گزارش شد و بتدریج درصد آن افزایش یافت تا اواسط دهه ۱۹۹۰ MRSA اکثراً از بیمارستان ها، خانه سالمندان جدا می شد. ریسک فاکتورهای کلونیزاسیون و عفونت با MRSA شامل مصرف آنتی بیوتیک، تماس با فردی که با MRSA کلونیزه دارد، جراحی و بستری درICU بود. اختلافی که MRSA بیمارستانی با CA- MRSA دارد در این است که CA-MRSA به دیگر آنتی بیوتیک هایی که روی استافیلوکوک تاثیر دارند اکثراً حساس (کلیندامایسین، اریترومایسین، کوتریموکسازول، کینولون ها، ریفامپین) ولی MRSA بیمارستانی به اکثر این آنتی بیوتیک ها مقاوم می‌باشد[۸،۹]. در نوع مقاومت به متی سیلین از هیچ یک از بتالاکتام ها نباید استفاده کرد زیراکه تاثیری روی میکروارگانیسم ندارند. این نوع مقاومت کروموزومال بوده و در آن ژن mecA موجب ایجاد تغییراتی در PBP2a شده که این تغییر منجر به کاهش میل ترکیبی (Affinity) PBP برای بتالاکتامها می‌شود. برای تشخیص این نوع ازمیکروارگانیسم ها می توان از آنتی بیوگرام به روش MIC استفاده کرد و یا می توان توسط PCR، ژن mecA را شناسائی کرد و داروی انتخابی آنها ونکومایسین و یا تئیکوپلانین (گلیکوپپتیدها) هستند[۱۰]. در این پژوهش سعی شده تا الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، بیوفیلم

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-21]

[DOI: 10.29252/aums.10.3.317]

و اشکال L استافیلوکوک های کواگولاز مثبت و منفی جدا شده از نمونه های بالینی با روش E-test و ELISA مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه های بالینی

تعداد ٤٣٧ نمونه بالینی که از بیمارستان مهرآیین تهران و سایر بیمارستان های درمانی در طول ٦ ماه جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. جمع آوری نمونه ها به تفکیک محل اخذ نمونه و تعداد آن در جدول ۱ آورده شده است. نمونه ارسالی از منابع زخم، خلط، پوست، خون، ادرار، آبسه، مایع مغزی و نخاعی گرفته شده است. نمونه ها بر روی محیط بلاد آگار برده شد و از کلنی های رشد کرده بر روی محیط های اختصاصی جهت تشخیص نهایی انتقال داده شد. رشد باکتری ها در محیط‌های آگار خوندار حاوی ۵٪ خون گوسفند، مانیتول سالت آگار، BHI Agar، BHI broth، LMP Agar وLPM broth مورد بررسی قرار گرفت[11]. نمونه ها شامل کشت خون (٨٤نمونه), ادرار (٥٨نمونه), عفونتهای زخم (٧٣نمونه), مایع مغزی نخاعی (٤٢نمونه) آبسه (٧٩نمونه) خلط (٥٢ نمونه) پوست (٤٩ نمونه) بود. پس از کشت دادن بر روی محیطهای مذکور، رنگ آمیزی کلنی های رشد یافته انجام شد و به دنبال آن از کلنی های کوکسی های گرم مثبت جهت تشخیص استافیلوکوک بودن از تستهای رشد در محیط مانیتول سالت آگار(۷/۵٪نمک) و رشد کلنی زرد و همچنین تست مقاومت به باسیتراسین انجام گرفت (قطر هاله کمتر از۱۰mmبرابر با مقاوم) [11].

محیط Milk Skim پرل دار

محیط کشت Milk Skim طبق دستور العمل کارخانه سازنده به میزان مورد نیاز ساخته و یک لوپ از کلنی های جوان به محیط فوق اضافه شد (بهتر است از کشت over night کلنی ها برداشته شود) و پس از انکوباسیون به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٧ oc ابتدا مایع موجود در داخل ظروف شیشه ای در شرایط استریل خالی شده و ظرف درب دار محتوی پرلها ذخیره شد. تریپتکاز سوی آگار در کشت‌های اولیه و پاساژهای بعدی *استافیلوکوکی* از زیستگاههای جلدی استفاده زیادی می‌گردد، روی این محیط تولید پیگمان آنها معمولا بارزتر از آگار خوندار است. بعضی از سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیس، استافیلوکوکوس اینترمدیوس و استافیلوکوکوس لوتئوس پرگنه های با پیگمان بنفش، صورتی، قهوه ای ایجاد می‌کنند. بسیاری از گونه های استافیلوکوک در محیط بی‌هوازی مثل تیوگلیکولات رشد خوبی دارند.

آزمایش دیسک دیفیوژن

محیط کشت مورد استفاده مولر هینتون آگار (مرک-آلمان) بوده که طبق دستور العمل کارخانه سازنده تهیه و سپس PH آن بین ٧/٤ – ٧/٢ تنظیم شد (توسط اسید کلریدریک نرمال) و سپس در اتوکلاو استریل گردید. تمامی دیسکهای خریداری شده (اگزاسیلین، سیپروفلوکساسین، پنی سیلین، اریترومایسین، تتراسایکلین، آمیکاسین، جنتامیسین) از شرکت Himedia(هایمدیا هند) از لحاظ کیفیت کنترل گردید. ابتدا سوسپانسیون میکروبی (۰/۵ مک فارلند) به روش مستقیم از سویه استاندارد ATCC 25923 تهیه شد. سپس توسط سوآپ استریل روی محیط مولر هینتون آگار کشت خطی داده شد و بعد از ۱۵ دقیقه دیسکها با فاصله mm ۲۲ از همدیگر و ١٦ mm از جداره پلیت در روی محیط کاشته شد. بعد از ۱۵ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ٢٤-١٨ ساعت انکوبه شد و سپس نتایج قرائت شده (قطر هاله عدم رشد با خط کش اندازه گیری شد) و نتایج بدست آمده برای هر دیسک آنتی بیوتیک با نتایج جدول CLSI برای آن دیسک آنتی بیوتیک مقایسه گردید تا کیفیت دیسک های مورد استفاده تائید شود[11].

آزمون E.TEST

جهت انجام این آزمون، همچون آزمون کربی - بائر، از محیط مولر هینتون آگار استفاده شد و با تهیه سوسپانسیون میکروبی با غلظت معادل نیم مک فارلند، تمام سطح محیط کشت را از باکتری پوشانده و سپس با یک پنس استریل نوارهای E –test را از پوشش مخصوص خارج کرده و بطور صحیح روی محیط کشت قرار داده سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷-۳۵ درجه برای ٢٤-١٨ ساعت انکوبه شد. ملاک تفسیر و مهار آنتی بیوتیک نقطه ای است که هیچ کلنی

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-21]
[DOI: 10.29252/aums.10.3.317]

باکتری رشد ننماید[11]. این تست به گونه‌ای است که به طور همزمان قطر هاله و MIC مربوط به آن آنتی‌بیوتیک به طور همزمان قرائت شده که بر حسب میلی متر و باجدول NCLSI ۲۰۱۳ مقایسه گردید. ضمنا جهت کنترل از سویه های استاندارد استافیلوکوک اورئوس و اپیدرمیس ذکر شده استفاده شد.

بررسی اشکال ال استافیلوکوک اورئوس

سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) و استافیلوکوکوس اپیدرمیس (PTCC 1435) که از مرکز علمی پژوهشی صنعتی تهیه شده بود کشت مجدد داده شد. در این آزمایش با توجه به امکانات و مواد در دسترس از دو نوع محیط کشت مختلف برای القای اشکال L استافیلوکوکوس اورئوس استفاده گردید که این دو محیط عبارتند از: محیط LPM فاقد سرم اسب و محیط LPM حاوی سرم اسب (ال فاز مدیوم). محیط مذکور با داشتن فنل رد، تغییرات pH محیط را که بیانگر رشد میکروارگانیسم ها هستند، به خوبی نشان می‌دهد. با حذف آگار از این محیط می توان LPM مایع تهیه نمود. بهترین زمان افزودن آنتی بیوتیک به این محیط، هنگامی است که دمای محیط حدود ٤٥ درجه سانتی گراد بوده و محیط کشت هنوز به صورت مذاب باشد. زمان افزودن سرم اسب (تهیه شده از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) بعد از اتوکلاو کردن، هنگامی است که دمای محیط حدود ٤٥ الی ٥٠ درجه سانتی گراد باشد. سرم اسب در شیشه های درپیچ دار استریل و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری می‌گردد. برای بررسی رشد باکتریهای معمولی و دیواره دار از محیط کشت BHI Agar و BHI broth استفاده شد که پروتوپلاست ها و اشکال L در آنها قادر به رشد نبودند ولی رشد باکتریهای عادی در محیط های LPM مایع یا جامد نیز مشهود بود.

روش سنجش بیو فیلم در تغییرات جذب نوری

این روش با استفاده از پلیت‌های با چاهکهای پلی استیرنی صورت می‌گیرد و بررسی توانایی جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* در تولید بیوفیلم، در محیط آزمایشگاه توسط روش گزارش شده به وسیله Peeters و همکاران در سال ۲۰۰۸ با مختصری تغییرات انجام گردید[12]. جدایه‌ها پس از کشت در TSB به مدت ٢٤-١٨ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵مک فارلند از هر کدام از ایزوله ها تهیه گردید و تمام چاهک ها در یک پلیت ۹٦ خانه ای با ۲۰۰میکرولیتر از محیط پر شدند ($\frac{CFU}{well}10^4$1/5×). به هر یک از چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر از استوک آنتی بیوتیکی و هر کدام از دو آنتی بیوتیک در حداکثر غلظت (پنی سیلین ۳۲ml/gμ و سیپرو فلوکساسین ٦٤ml/gμ) ریخته شد و رقت سازی به صورت سریالی انجام گردید. به مدت ٢٤ ساعت و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.بعد از خالی کردن محتویات چاهک ها شستشوی آنها به میزان ۲۰۰ میکرولیتر و سه بار توسط PBS انجام گردید. پس از ۱۵ دقیقه الکل خارج و پلیت در هوا خشک گردید. به تمام خانه ها۱۰۰ میکرولیترکریستال ویوله ۲٪ اضافه و پس از ۲۰ دقیقه پلیت‌ها در زیر شیر آب شستشو شد تا رنگ اضافی از گوده ها خارج شود. سپس اسید استیک ۳۳٪ حدود ۱۵۰ میکرولیتر به پلیت ها جهت آزاد شدن رنگ، اضافه گردید. جذب نوری(OD)هر یک از خانه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از الایزا ریدر اندازه گیری شد (با۳ تکرار). ضمنا از کنترل منفی (بدون سوسپانسیون آنتی بیوتیک) وکنترل مثبت (ATCC-25923) استفاده شد و توانایی تشکیل جذب نوری در ٤ ساعت ثبت گردید.

OD= میزان جذب نوری

OCD= میزان جذب نوری کنترل منفی

ODC > OD = عدم اتصال

2×ODC<OD<4×ODC= متوسط

ODC<OD<2×ODC= ضعیف

4×ODC<OD= قوی و در انتها درصد کاهش بیو فیلم بواسطه آنتی بیوتیک ها را می‌توان از طریق جذب نوری چاهک تیمار شده، شاهد، کنترل طبق فرمول زیر بدست آورد.

$$\text{Percentage reduction} = \left[\frac{(C-B)-(T-B)}{}\right] \times 100$$

C= میانگین جذب نوری چاهکهای کنترل B= میانگین جذب نوری چاهکهای شاهد T=میانگین جذب نوری چاهکهای تیمار شده.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-21]

[DOI: 10.29252/aums.10.3.317]

نتایج

در این مطالعه نتایج حاصل از بررسی ٤٣٧ مورد از آلودگیهای استافیلوکوکی کوآگولاز مثبت و منفی به روشهای مختلف در جدول۱ آورده شده است.

بررسی‌ها نشان داد که بیشترین مقاومت آنتی بیوتیک و حساسیت به ترتیب مربوط به پنی سیلین، جنتامایسین و آمیکاسین بوده است.

جدول ۱ : فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اپیدرمیس* جدا شده از بیمارستان مهر آیین تهران به تفکیک محل اخذ نمونه

نوع نمونه	تعداد موارد مثبت کشت	استافیلوکوکوس اپیدرمیس	استافیلوکوکوس اورئوس
خون	٦٧	٤٣	**٢٤**
زخم	٥٦	٣٩	**٢٧**
ادرار	٤٩	٣٣	**١٦**
پوست	٣٧	٢١	**١٦**
خلط	–	–	–
CSF	٣١	١٩	–
آبسه	٦٢	٥٨	**٦**

جدول ۲ : نتایج حاصل از آزمایش دیسک دیفیوژن بر حسب میلی متر بر روی سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC٢٥٩٢٣

آنتی بیوتیک ها	محتویات دیسک	قطر هاله استاندارد NCCLS (mm)	نتیجه آزمایش ها(mm)
اگزاسیلین	mg۱	۱۸-۲۴	**۲۱**
سیپروفلوکساسین	mg۵	۲۲-۳۰	**۲۶**
پنی سیلین	mg۱۰	۲۷-۳۷	**۳۰**
اریترومایسین	mg۱۵	۲۲-۳۰	**۲۴**
تتراسایکلین	mg۳۰	۲۴-۳۰	**۲۷**
آمیکاسین	mg۳۰	۲۰-۲۶	**۲۲**
جنتامیسین	mg۱۰	۱۹-۲۷	**۲۵**

جدول ۳ : نتایج حاصل از آزمایش دیسک دیفیوژن بر روی نمونه های بالینی جدا شده

	حساس			**نیمه حساس**			**مقاوم**		
نتیجه آزمایش	بالینی		مسمومیت غذایی	بالینی		مسمومیت غذایی	بالینی		**مسمومیت غذایی**
آنتی بیوتیک									
جنس	اورئوس	اپیدرمیس	اورئوس	اورئوس	اپیدرمیس	اورئوس	اورئوس	اپیدرمیس	**اورئوس**
استافیلوکوکوس									
پنی سیلین	–	–	–	–	۲	–	۲۰	۱۰	**۱۸**
اگزاسیلین	٤	٤	٦	۳	–	۳	۱۳	۸	**۹**
جنتامیسین	۹	۳	۷	۷	۵	٦	٤	٤	**۵**
تتراسایکلین	۷	۲	۸	۵	۵	٦	۸	۵	**٤**
اریترومایسین	۲	–	–	۹	۲	۱۰	۹	۱۰	**۸**
سیپروفلوکساسین	٦	۵	۲	۸	٤	۱۰	٦	۳	**۸**
آمیکاسین	۹	۳	٦	۸	۷	۲	۳	۲	**۱۰**

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-21]

[DOI: 10.29252/aums.10.3.317]

جدول ٤ : نتایج حاصل از آزمایش E-TEST بر اساس قطر هاله بر حسب میلی متر

آنتی بیوتیک نتیجه آزمایش	حساس		نیمه حساس		مقاوم	
منبع	بالینی		بالینی		بالینی	
جنس استافیلوکوکوس	اورئوس	اپیدرمیس	اپیدرمیس	اورئوس	اپیدرمیس	**اورئوس**
جنتامیسین	۲	–	۲	۱	–	–
تتراسایکلین	۱	۱	۱	۲	–	–
اریترومایسین	–	–	۱	۱	۱	**۲**
سیپروفلوکساسین	۲	۲	۱	–	–	–
آمیکاسین	۲	۱	–	۱	۱	–

نتایج آزمونE-TEST با توجه به محدود بودن نوارهای مذکور انجام این آزمایش فقط بر روی تعداد محدودی از نمونه‌های استافیلوکوک بالینی صورت گرفت (برای هر آنتی بیوتیک ۵ نوار) (جدول ٤). بر اساس نتایج بدست آمده بیشترین مقاومت مربوط به اریترومایسین و بیشترین حساسیت مربوط به سیپروفلوکساسین بدست آمد.

نتایج حاصل از آزمایش تعیین MIC بر روی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده و اخذ شده با روش ماکرودایلوشن : در این مرحله از تحقیق بر روی تمامی ۳۲ سویه استافیلوکوکوس اورئوس و ۱۲ سویه استاف اپیدرمیس و ۱۸ سویه استاف غذایی آزمایش تعیین MIC با روش آگار دایلوشن و با استفاده از آنتی بیوتیکهای پنی سیلین و سیپروفلوکساسین انجام گرفت و نتایج مندرج در جدول ۵ مشاهده می‌شود. لازم به ذکر است که مطابق جدول NCCLS برای آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین برای حالت مقاوم ٤ ≤ وبرای حالت نیمه حساس مساوی ۲ و برای حالت حساس ۱ ≤ ($\mu g / ml$) و برای سویه استافیلوکوکوس اورئوس در نظر گرفته می‌شود و برای آنتی بیوتیک پنی سیلین برای حالت مقاوم ۰/۵ ≤ و حساس ۰/۲۵ ≤ در نظر گرفته می‌شود. در مقایسه پنی سیلین مقاومت بیشتری را نسبت به سیپرو فلو کساسین از خود نشان داد.

جدول ۵: نتایج حاصل از آزمایش تعیین MIC بر روی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده و اخذ شده با روش ماکرودایلوشن برحسب میکروگرم بر میلی گرم

حساسیت آنتی بیوتیکی	حساس(S)			(I)نیمه حساس			(R)مقاوم		
منبع	بالینی		غذایی	بالینی		غذایی	بالینی		**غذایی**
جنس استافیلوکوکوس	اورئوس	اپیدرمیس	اورئوس	اورئوس	اپیدرمیس	اورئوس	اورئوس	اپیدرمیس	**اورئوس**
پنی سیلین ۰/۲۵≤حساس($\mu g/mg$) نیمه حساس ۰/۲۵ ۰/۵ ≤ مقاوم	–	۱	۱	۱	۵	۳	۱۹	٦	۱٤
سیپرو فلوکساسین ۱ ≤حساس($\mu g/mg$) نیمه حساس ۲ ٤ ≤ مقاوم	۳	۵	۵	۷	٤	٦	۱۳	۳	۷

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-21]

[DOI: 10.29252/aums.10.3.317]

بحث و نتیجه گیری

نقش این باکتری در ایجاد باکتریمی، سپتی سمی، انـدوکاردیت حاد و عفونت هایی که منشاء خـونی دارنـد (بـویژه عفونـت هـای مزمن یا عود کننده پس از قطع مصرف دارو) ما را برآن داشـت تـا پایداری یا ناپایداری اشکال L استافیلوکوکوس اورئـوس را کـه در غلظت های مختلف ونکومایسین القا شـده‌انـد بررسـی نمـاییم. در محیط های LPM broth، علاوه بر باکتریهای مرحلـه L، باکتریهـای عادی نیز قادر به رشد و تکثیر می باشند و همانند اشکال L، سـبب ایجاد کدورت و تغییر رنگ محیط از قرمز بـه نـارنجی یـا زرد مـی شوند. باید به این نکته نیز توجه داشت که باکتریهای عادی این کار را در مدت ٤ یا حداکثر ٤٨ ساعت انجام می دهند، ولـی اشـکال L پس از ۳ الی ۷ شبانه روز قادر به انجام این کار می باشـند. در ایـن آزمایش نیز ایجاد کدورت و تغییر رنگ در محـیط LPM broth، در فاصله روزهای سوم تا ششم صورت می گرفت. از آنجا که برخـی از باکتری‌ها نظیر استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوکوس فکالیس تا چند دهه گذشته نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک ها بویژه انـواع پنی سیلین‌ها حساس بوده انـد، امـروزه مقاومـت قابـل تـوجهی در برابر این آنتی بیوتیک ها یافته و عفونت های مزمن، عـود کننـده و تقریباً غیر قابل درمانی از این باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک مـی-باشد. مطالعه و تحقیق بر روی نحوه القای اشـکال L در مجـاورت غلظت های مختلف آنتی بیوتیک های موثر بر سنتز دیـواره سـلولی امری ضروری به نظر مـی رسـد. جداسـازی اشـکال L باکتریهـا از مایعات و بافتهای مختلف بدن انسان و برخی از حیوانات سـالم یـا دچار عفونت های حاد و مزمن، اشکال L در هنگام مواجهه باکتریها با غلظت های مختلف آنتی بیوتیک ها بویژه آنتی بیوتیک های موثر بر دیواره سلولی، القای اشکال L در نتیجه تاثیر عوامل دفاعی میزبان از قبیل پروتئین های کمپلمان و یا برخی از انواع آنتی بادی بر روی باکتریها، زنده باقی مانـدن اشـکال L برخـی از باکتریهـا در داخـل گلبولهای سـفید بیگانـه خـوار، الگوهـای فیزیولـوژی، سـاختمانی، متابولیکی و حساسیت داروئی اشکال L که آنها را تا حد زیـادی از باکتریها عـادی و دیـواره دار متمـایز مـی سـازد، همگـی از جملـه مواردی هستند کـه بـر اهمیـت مطالعـه و تحقیـق بیشـتر بـر روی خصوصیات مختلف اشکال L علیـرغم مشـکلات خاصـی از قبیـل کشت، جداسازی، تشخیص و یا نگهداری طولانی مدت این اشکال تاکید می نمایند. با وجود تمامی تحقیقاتی که طی چنـدین دهـه بـر روی این باکتریها صورت گرفته ولی هنوز اطلاعات ما در رابطه بـا نحوه تکامل و مراحل تکاملی این میکروارگـانیزم هـا، خصوصـیات ژنتیکی آنهـا، واکـنش متقابـل بـین آنهـا و سیسـتم ایمنـی میزبـان، چگونگی دخالت آنها در مزمن شدن و یا عود عفونت هـا و نظـایر آن بسیار اندک می باشد [۱۳]. در مطالعه ای در ایران تعداد ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران بستری در بیمارسـتانهای شـهر تبریز در مدت ۱۱ماه ایزوله شد. تمامی سویه‌ها بـه کمـک تسـتهای میکروسکوپی، کواگولاز، کاتالاز، Dnase تعیین هویت شد و سـپس حساسیت سویه ها دربرابـر وانکومایسـین بـه روش دیسـک آگـار دیفیـوژن و Minimum inhibitory concentration (MIC) آنهـا باروش E-test تعیین شد ونتایج باهم مقایسه گردید [۱٤]. Sakoulas و همکاران در سال ۲۰۰٤ برای شناسایی سویه های دارای مقاومت ناهمگون نسبت به وانکومایسـین از روش آنـالیز جمعیتـی اسـتفاده کردند. از ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئـوس بررسـی شـده، ۹۸٪ آنها به وانکومایسین حساس و دامنه MIC سویه های آزمایش شده بین ۱/۵ g/mlμ تا ۳g/mlμ بـود. فقـط دومـورد ایزولـه بـا 4μg/ml =MICبه دست آمدکه مطالعات بعدی باروش آنالیز جمعیتی سویه-های استافیلوکوکوس اورئوس دارای مقاومت نـاهمگون نسـبت بـه وانکومایسین دراین ایزوله‌ها بـا MIC ≥8g/mlμ بـود [۱۵]. درتسـت حساسیت ۱۱ نوع آنتی‌بیوتیک با روش دیسـک آگـار دیفیـوژن نیـز حساسیت سویه‌ها بدین ترتیب بود:

وانکومایسـین(۱۰۰%)، ریفـامپین(۱۰۰٪)، سپیروفلوکساسـین (۱۰۰%)، کوتریموکسـازول(۱۰۰%) سـفالوتین(۷٤٪)، متـی سیلین(٦۲٪)، کلرامفنیل(٤٤٪)، کلیندامایسین(٤۳٪)، جنتامیسین(۳٦ ٪)، اریترومایسین(۳۱٪) و پنی سیلین G(۱٪). نتایج مطالعه نشـان داد که از وانکو مایسین هنوز مـی‌تـوان در درمـان اسـتافیلوکوکوس اورئوس استفاده کرد ولی باتوجه به اینکه در ایـن میـان فقـط ۱۰۰ سویه بالینی بررسی شد مواجهه با دو سویه دارای مقاومت ناهمگون نسبت به ونکومایسین(۲٪) بود و نیز ظهـور سـویه هـای اسـتافیلو کوکوس اورئوس با مقاومت حد واسط و مقاومت کامـل در برخـی از کشورهای جهان انجـام تسـتهای حساسـیت بـه روش و تعیـین

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-21]
[DOI: 10.29252/aums.10.3.317]

MICقبل از شروع درمان،جهت مشخص شدن حساسیت سویه های مورد آزمایش در مقابل وانکو مایسین، در ردیابی سویه های مقاوم احتمالی وکاهش بروز مقاومتهای بیمارستانی و جلوگیری از شیوع سویه های مقاوم اهمیت زیادی دارد [۱۵]. Islam و همکاران (۲۰۰۸) با تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) از CLOXACILLIN برای سوش ایزوله منتخب از استافیلوکوکوس ارئوس های مقاوم به متی سیلین(MRSA) به وسیله الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها (Antibiogram) پرداختند. حداقل غلظت مهاری (MIC) نشان دهنده میزان غلظت ماده ضد میکروبی است که به طور کامل از رشد ارگانیسم ممانعت میکند. به منظور تعیین MIC (CLOXACILLIN) از۱۰ MRSA که قبلا از ٤٠ نمونه ایزولهی بالینی استافیلوکوکوس اورئوس توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) تشخیص داده شده بود استفاده شد [۱۶].

Afrozو همکاران در سال ۲۰۰۸ در نمونه های بالینی که از بیمارستان کالج پزشکی Mymensingh در شهر Mymensingh جمع آوری شد و مطالعه در گروه پزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه کشاورزی Mymensingh بنگلادش از جولای ۲۰۰٦ تا ژوئن ۲۰۰۷ انجام شد، MIC (CLOXACILLIN) برای ۵ سویه ازMRSA ۳۲ (میکروگرم / میلی لیتر)، برای ۱سویه ۱۲۸ (میکروگرم / میلی لیتر) بود و برای ٤ سویهی دیگرMRSA بالای ۱۲۸ (میکروگرم / میلی لیتر) بود. تست حساسیت ضد میکروبی ازارگانیسم های جدا شده با روش دیسک دیفیوژن انجام شد. در تست حساسیت آنتی بیوتیکی، سویه های MRSA در برابر آنتی بیوتیک های penicillin, oxacillin, amoxicillin، cloxacillinو مقاومت ۱۰۰درصدی نشان دادند. صد در صد حساسیت, MRSA در برابر vancomycin, Ciprofloxacin, erythromycin, fusidic acid, rifampicinمشاهده شد[۱۷،۱۶]. Hibma و همکاران عفونت و حذف از فرم L لیستریا مونوسیتوژنز با باکتریوفاژ پرورش یافته را بررسی نمودند. پرورش فاژ برای تولید یک باکتریوفاژ خاص که برای فرم L مونوسیتوژنز مورد استفاده قرار گرفت .فاژ پرورش یافته با خانواده فاژ پرورش نیافته از نظر فعالیت لایتیک و ویژگیهای خاص مقایسه شد.آن همچنین توانایی برای جلوگیری از L فرم را دارد و از بیوفیلم در فولاد زنگ آهن تست شده است و در مقایسه با یک اسید آلی در L فرم بیوفیلم در فعال سازی در فولاد ضد زنگ است[۱۸]. Hiramatsu و همکاران ۱۹۹۷ به بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوک-های جدا شده از انسان و حیوان پرداختند. مقاومت های آنتی میکروبیال چند وجهی پاتوژن های باکتریایی هم در دنیای پزشکی انسان ها و حیوانات موضوع مهمی است. مقاومت آنتی میکروبیال مشکلات جدی در درمان حیوانات و گیاهان ایجاد کرده است.استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به تعدادی از آنتی میکروبیال ها مقاوم میباشد. (MRSA) اختصار Methicillin resistant staphylococcus aureus میباشد.این مطالعه مقاومت MRSA را در مقابل داروهای مختلف نشان میدهد. در این پژوهش با استفاده از آگار تعیین MIC کلوکساسیلین مورد بررسی قرار گرفت. در نتیجه مشخص گردید که گونه های MRSA در مقابل پنی سیلین،اکساسیلین و آموکسی سیلین ۱۰۰درصد مقاومت نشان دادند. پس از اندازه گیری حداقل بازدارنده MIC کمک مهمی در تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی به باکتری مینماید[۱۹]. Birmingham و همکاران در سال ۲۰۰۸ به بررسی اشکال L- Form در ارتباط با مایکو پلاسما پرداختند. یک برنامه دوساله جهت بررسی امکان کشت L فرم به طور معمول و تعیین تاثیر چنین برنامهای آغاز شد. در رابطه با تعداد نمونهها، در واقع تعداد کمی L فرم جدا شد که در مقایسه با مقدار تجهیزات و زمان مورد نیاز تکنیسین بازده ناچیز بود. تنها ٪۰/۵ از تمامی نمونههای ادراری برای L فرم مثبت بودند. هنگامی که کشت L فرم به بیماران با تشخیص عفونت یا پیلونفریت محدود بود به ٪۱/۲ افزایش یافت. توصیه میشود این روش برای آن دسته از بیمارانی که سابقه طولانی از عفونت های دستگاه ادراری دارند و تلاشهای دیگر برای درمان بیمار باشکست مواجه شده استفاده شود. [۲۰-۲۲]. طی مطالعهای که کاوسی نژاد در بین کارکنان بیمارستان های شهر بابل انجام داد حالت ناقلی استافیلوکوک اورئوس در قسمت قدامی بینی کارکنان در حدود ٤٤/۳٪ بوده و این رقم در کارکنان آزمایشگاه ها و بخش بیماری های عفونی بیش از سایر بخش ها (٦٦٪) گزارش گردیده است. ولی در مطالعه ای که در سال ۱۳٦۵ در کارکنان بعضی از بیمارستانهای آموزشی دانشگاه اصفهان انجام شد در کشت نمونه سواب ناحیه قدامی بینی و گلوی ٤۰/۵ درصد آنان استافیلوکوک اورئوس رشد کرده و این رقم نسبت به تهران کمتر بوده است. به طوری که طی مطالعه دیگری که در مرکز آموزشی درمانی لقمان

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-21]

[DOI: 10.29252/aums.10.3.317]

حکیم انجام شد، مشخص گردیده که الگوی حساسیتی استافیلوکوک اورئوس جدا شده از کشت سواب قسمت قدامی بینی ۳۰۰ نفر از کارکنان و مراجعین به درمانگاه های عفونی و داخلی، در ۱۰۵ نفر از آنان حالت ناقلی استافیلوکوک اورئوس را نشان داده است و اکثرا نسبت به کلوکساسیلین، حساس بوده‌اند که این رقم در شهر گرگان از تهران نیز کمتر بوده است [۲۳]. طی مطالعه ای که شاکری و همکاران در سال های ۷۸-۱۳۷۷ به تعداد ۱۱۹۳ نفر از دانش آموزان شهر گرگان انجام شد مشخص گردیده است که نمونه سواب قسمت قدامی بینی آنان در ۱۶/۳٪ آنان استافیلوکوک اورئوس را نشان می دهد و تعداد باکتری های جدا شده در نقاط روستائی نیز در همین حدود (۱۷/۶٪) بوده است. طی یک بررسی که در دانشگاه علوم پزشکی انجام شده، مشخص گردیده است که استاف اورئوس نسبت به پنی سیلین و آموکسی سیلین، صددرصد مقاوم و نسبت به سفالوتین و ونکومایسین بیشترین حساسیت را نشان می‌دهد [۲۴،۲۵]. همچنین باکتری نسبت به آموکسی سیلین، سفالوتین، اریترومایسین، تتراسیکلین، گلوگزاسیلین، پنی سیلین، سولفامتوکسازول، سیپروفلوکساسین، ونکومایسین، داکسی سیکلین، سفتریاکسون، حساسیتی کمتراز ۵۰٪ از خود نشان داده است. ضمنا در مطالعه ای که در بیماران و مراجعین به بیمارستان ها و درمانگاه های شهر بابل انجام شده است ۷۶٪ استافیلوکوک های جدا شده، نسبت به اگزاسیلین، تمامی موارد نسبت به پنی سیلین و ۶۵٪ نسبت به تری‌متوپریم، مقاوم بوده و کلیّه موارد مقاوم به اگزاسیلین، نسبت به وانکومایسین نیز مقاوم بوده اند [۲۶]. طبق مطالعه ای که Baker و همکاران در سال های ۱۹۹۹-۱۹۹۸ بصورت Multi central در ایالات متحده امریکا انجام شد متوجه گردیدند که اولاً همه VISA ها، MRSA نیستند و ۱/۳ موارد به اگزاسیلین حساس بودند. ثانیاً مقاومت به آنتی بیوتیک های دیگر مثل تتراسیکلین، کوتریموکسازول، ریفامپین، اریترومایسین، کلیندامایسین و با درصد زیادی وجود دارد ولی همه سوش ها را شامل نمی شود. بنابراین در صورتی که تست حساسیت استانداردی را انجام دهیم، می توانیم در صورت وجود، آنتی بیوتیک هایی که میکروارگانیسم به آن حساس است آن ها را شناسائی کرده و مورد استفاده قرار دهیم. ثالثاً در هر صورت اکثریت قریب به اتفاق این میکروارگانیسم ها به Linezolid و سینرسید حساس هستند و ثالثا این ارگانیسم ها در جامعه بسیار نادر است و اکثر آنها در بیمارستان ها دیده می شود [۲۷،۲۸]. مطالعه ای در استرالیا توسط مارتین در سال ۲۰۰۹ در خصوص تاثیر ترکیبی ضدعفونی کننده های الکل، کلروهگزیدین و هایژن به مدت ۶ ماه بر روی عفونت های باکتریال انجام گرفت که نتایج این پژوهش نشانگر کاهش ۴۰ درصدی میزان استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از بیمارستان و کاهش ۹۰ درصدی در گونه های اشریشیاکلی و کلبسیلا جداسازی شده از بیمارستان بود [۲۹،۳۰]. در سالهای ۲۰۰۹ و ۲۰۱۰ Pascuale اسپانیایی به مطالعه روند چسبیدن استافیلوکوکوس اورئوس به بیومتریالهای پلاستیکی نیروهای الکترواستاتیک، واندروالس و هیدروفوبیک پرداخته که مهمترین نقش را در میان کنش (اینترکنش) باکتریها ایفا می کنند، ضمناً این باکتری تمایل زیادی به چسبیدن به سطوح هیدروفوبیک دارد و سویه های هیدروفوبیک نیز تمایل بیشتری به چسبیدن به سطوح تفلونه دارد [۳۱]. در سال ۱۹۹۶ Baldassarri و همکارانش با خالص سازی بیوفیلم استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مشخص ساختند که ترکیب بیو فیلم چیزی جز ادهزینهای پلی ساکاریدی و آنتی ژنهای مرتبط با لایه لعابی و ادهزینهای پلی ساکاریدی داخل سلولی نمی باشد [۳۲]. Stewart و Hardman در سال ۱۹۹۷ برای اولین بار پدیده کروم سنسینگ را در بیان ژنهای ica موثر دانستند و ادعا داشتند این پدیده در بیان ژن استافیلوکوکهای اپیدرمیدیس پاتوژن موثر است [۳۳]. در نتیجه محققان معتقدند که غلظت آنتی بیوتیک در القای اشکال L در بدن نقش تعیین کننده ای ندارد، بلکه بروز نوترکیبی ها و جهش های ژنتیکی و در نتیجه ظهور باکتریهای مقاوم به دارو در بدن انسان و حیوانات سبب ناکارآمد شدن درمانهای آنتی بیوتیکی می گردد. یکی از راههای مقاوم شدن باکتریها به آنتی بیوتیک ها، ایجاد اشکال L، پروتوپلاست ها و اسفروپلاست ها می باشد. این اشکال باکتریائی، بدلیل فقدان پپتیدوگلیکان، در مقابل آنتی بیوتیک های ممانعت کننده از سنتز پپتیدوگلیکان نظیر انواع پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها و آنتی بیوتیک های گلیکوپپتیدی (وانکومایسین و تیکوژلانین) مقاوم هستند. از طرفی، بازگشت آنها به شکل دیواره دار و نیز قابلیت رشد و تکثیر اشکال L در محیط های هیپرتونیک و پس از حذف دارو از محیط می تواند دلیل موجهی برای آن دسته از محققینی باشد که اشکال L را در ایجاد عفونت های مزمن و یا عود مجدد

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-21]
[DOI: 10.29252/aums.10.3.317]

عفونت ها پس از توقف مصرف آنتی بیوتیک ها یا بدلیل عدم مصرف درست و به موقع این داروها دخیل بدانند.

Reference

1. Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 27 E: McGraw Hill Professional; 2015.
2. Cadena J, Sreeramoju P, Nair S. Diagnostic microbiology and infectious disease. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;74(1):16-21.
3. Graham PL, Lin SX, Larson EL. A US Population-Based Survey of Staphylococcus aureus ColonizationEpidemiology of S. aureus. Ann Intern Med. 2006;144(5):318-25.
4. O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA, Loughman A, et al. A novel Staphylococcus aureus biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. J Bacteriol. 2008;190(11):3835-50.
5. Singhal D, Foreman A, Bardy JJ, Wormald PJ. Staphylococcus aureus biofilms. The Laryngoscope 2011;121(7):1578-83.
6. Walker R, Buckley M. Probiotic microbes: the scientific basis. 2006.P:269-96.
7. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et al. Invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in the United States. Jama 2007;298(15):1763-71.
8. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, et al. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis. 2011;11(8):595-603.
9. Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen J, Harbarth S, Kluytmans J, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. Eurosurveillance. 2010;15(41):19688.
10. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in adults and children. Clin Infect Dis. 2011;52(3):e18-e55.
11. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology-E-Book: Elsevier Health Sciences; 2014.
12. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Resistance of planktonic and biofilm-grown Burkholderia cepacia complex isolates to the transition metal gallium. J Antimicrob Chemother. 2008;61(5):1062-5.
13. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T. Jawetz, Melnick, Adelberg Medical Microbiology: Placebo doo; 2015.
14. Khatib R, Johnson LB, Fakih MG, Riederer K, Khosrovaneh A, Shamse Tabriz M, et al. Persistence in Staphylococcus aureus bacteremia: incidence, characteristics of patients and outcome. Scand J Infect Dis. 2006;38(1):7-14.
15. Sakoulas G, Moise-Broder PA, Schentag J, Forrest A, Moellering RC, Eliopoulos GM. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia. J Clin Microbiol. 2004;42(6):2398-402.
16. Islam M, Alam M, Choudhury M, Kobayashi N, Ahmed M. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of cloxacillin for selected isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) with their antibiogram. Bangladesh J Vet Med. 2008;6(1):121-6.
17. Afroz S, Kobayashi N, Nagashima S, Alam MM, Hossain A, Rahman MA, et al. Genetic characterization of Staphylococcus aureus isolates carrying Panton-Valentine leukocidin genes in Bangladesh. Jpn J Infect Dis. 2008;61(5):393-6.
18. Hibma AM, Jassim SA, Griffiths MW. Infection and removal of L-forms of Listeria monocytogenes with bred bacteriophage. Int J Food Microbiol. 1997;34(3):197-207.
19. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of Staphylococcus aureus heterogeneously resistant to vancomycin. The Lancet 1997;350(9092):1670-3.
20. Birmingham CL, Higgins DE, Brumell JH. Avoiding death by autophagy: interactions of Listeria monocytogenes with the macrophage autophagy system. Autophagy 2008;4(3):368-71.
21. Bowman JP, Bittencourt CR, Ross T. Differential gene expression of Listeria monocytogenes during high hydrostatic pressure processing. Microbiol. 2008;154(2):462-75.
22. Errington J. L-form bacteria, cell walls and the origins of life. Open biology 2013;3(1):120143.
23. Kavoosinezhad F, Fattahi E, Bakhtiari N. Antibiotic

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-21]

[DOI: 10.29252/aums.10.3.317]

resistance in Staphylococcus aureus isolated from clinical samples by disk diffusion and PCR methods. Journal of Gorgan University of Medical Sciences 2016;18(2).

24. Shakeri F, Ghaemi E .Typing of Staphylococcus aureus in Gorgan city by sequencing of protein gene The First International Congress of Medical Bacteriology; 2011: Tabtiz university of medical sciences.
25. Rahimi-Alang S, Asmar M, Cheraghali F, Yazarlou S, Amini A, Shakeri F, et al.Antibiotics Susceptibility Pattern in Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus Isolated from Hosbital Staff and Patients in Gorgan. The 13th Iranian & The Second International Congress of Microbiology, July 14 – 16, 2012, Ardabil – Iran.[In Persian].
26. Kamarehei F, Rahimi-Alang S, Vaez H, Ghaemi E. Prevalence of Panton-valentine gene in Staphylococcus aureus isolated from clinical samples and healthy carriers in Gorgan city, north of Iran. Minerva biotecnologica 2015;27(1):51-4.
27. Campbell JR, Zaccaria E, Mason EO, Baker CJ. Epidemiological analysis defining concurrent outbreaks of Serratia marcescens and methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a neonatal intensive-care unit. Infection Control & Hospital Epidemiology 1998;19(12):924-8.
28. Kampf G, Jarosch R, Rüden H. Limited effectiveness of chlorhexidine based hand disinfectants against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). J Hosp Infect. 1998;38(4):297-303.
29. Martin FJ, Gomez MI, Wetzel DM, Memmi G, O'seaghdha M, Soong G, et al. Staphylococcus aureus activates type I IFN signaling in mice and humans through the Xr repeated sequences of protein A. J Clin Invest. 2009;119(7):1931.
30. Donald RG, Skwish S, Forsyth RA, Anderson JW, Zhong T, Burns C, et al. A Staphylococcus aureus fitness test platform for mechanism-based profiling of antibacterial compounds. Chem Biol. 2009;16(8):826-36.
31. Pascual A, Fleer A, Westerdaal N, Verhoef J. Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to Teflon catheters in vitro. Eur J Clin Microbiol. 2009;5(5):518-22.
32. Baldassarri L, Donnelli G, Gelosia A, Voglino MC, Simpson AW, Christensen GD. Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigen and its occurrence among Staphylococcus epidermis clinical isolates. Infect Immun. 1996;64(8):3410-5.
33. Hardman AM, Stewart GS, Williams P. Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. 1998;74(4):199-210.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-21]

[DOI: 10.29252/aums.10.3.317]

AUMJ Alborz University of Medical Sciences Journal
Alborz University of Medical Sciences Journal, August 2021, Vol. 10, No. 3: 317-328 *Original Article*

***Kumarss Amini*[1], *Behrooz Shojaei sadi* *[2], *Ehsan Estabraghi*[3]**

[1] *Associated Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.*
[2] *Asistant Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.*
[3] *Faculty Member, Department of Veterinary Medicine, Shahrbabak Branch, Islamic Azad University, Shahrbabak, Iran.*

Antibiotic Resistance, Biofilm and Forms of L. Staphylococcal Coagulase Positive and Negative Strains Isolated from Clinical Specimens by E-test and ELISA

Received: 12 Apr 2020; Accepted: 2 Aug 2020

Abstract

Introduction: Staphylococcus aureus is a micrococcal, gram positive and positive catalase family with oxidative metabolism and fermentation metabolism. *Staphylococci* are a large group of skin inhabitants, mammals are mammals. In some of these bacteria, the peptidoglycan layer has completely disappeared, and some still have small portions of it. The purpose of this study was to investigate antibiotic resistance, biofilm and forms of L. Coagulase positive and negative *staphylococci* isolated from clinical specimens by E-test and ELISA.

Methods: A total of 437 clinical specimens were collected from the Tehran Mehr Hospital and other treatment centers during 6 months and transferred to the laboratory. The specimens were first transferred to the Blood agar environment and then from colonies on specific environments for final diagnosis. The growth of bacteria in the four media was also evaluated by BHI Agar, BHI broth, LMP Agar and LPM broth. Biofilm measurements were performed by light absorption and using a well plate. In the E.test test, antimicrobial resistance such as Kirby-Boer test was used from the Muller Hinton Agar medium.

Findings: The highest resistance and antibiotic susceptibility were penicillin and gentamicin, amikacin, respectively. The results of the E-TEST test based on the halo diameter showed the highest resistance to erythromycin with 1 mm and the highest sensitivity to ciprofloxacin with 2 mm.

Discussion and Conclusion: The results of MIC determination on Staphylococcus aureus strains isolated by penicillin microdilution showed more resistance to ciprofloxacin. Consequently, L-forms, bacterial protoplasts and Spheroplasts are resistant to peptidoglycan synthesis, such as penicillins, cephalosporins and glycopeptide antibiotics (vancomycin and tiopelanin), due to the lack of peptidoglycans.

Keywords: Staphylococcus aureus, Antibiogram, ELISA test, Biofilm

***Corresponding Author:**
Asistant Professor,
Department of Microbiology,
School of Basic Sciences,
Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.

Tell: :09183639722
E-mail:: shojaee_sadi@yahoo.com

نشریه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی البرز، تابستان ۱۴۰۰؛ دوره ۱۰، شماره ۳ ۳۱۷ تا ۳۲۸

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2025-03-21]

[DOI: 10.29252/aums.10.3.317]