

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

تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۱/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۵/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: 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 پپتیدوگلیکان کاملاً از بین رفته و در برخی نیز هنوز بخش‌های کوچکی از آن باقی است. هدف از این پژوهش بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، بیوفیلیم 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 ۴۳۷ نمونه بالینی که از بیمارستان مهر آیین تهران و سایر مراکز درمانی در طول ۶ 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 باکتری‌ها در محیط چهارگانه نیز BHI Agar، BHI broth، LMP Agar و LPM broth مورد بررسی قرار گرفت. سنجش بیوفیلیم با جذب نوری و استفاده از پلیت چاهک انجام شد. در آزمون E-TEST مقاومت آنتی بیوتیکی همچون تست کربی - بائر، از محیط مولر هیتون 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 ماکرودایلوژن در پنی سیلین مقاومت بیشتری را نسبت به سیپروفلوکساسین نشان داد. در نتیجه اشکال L، پروتوپلاست‌ها و اسفروپلاست‌ها باکترائی، بدلیل فقدان پپتیدوگلیکان، در مقابل آنتی بیوتیک‌های ممانعت کننده از سنتز پپتیدوگلیکان نظیر انواع پنی سیلینها، سفالوسپورینها و آنتی بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی (ونکومایسین و تیکوپلانیلین) مقاوم هستند.

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

کیومرث امینی^۱، بهروز شجاعی
سعدی^{۲*}، احسان استبرقی^۳

^۱ دانشجویار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.
^۲ مربی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.
^۳ عضو هیات علمی، گروه دامپزشکی، واحد شهرریاک، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرریاک، ایران

نویسنده مسئول:

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

۰۹۱۸۳۶۳۹۷۳۲

E-mail: shojaee_sadi@yahoo.com

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس از خانواده میکروکوکاسه و این خانواده شامل جنس های دیگری مانند میکروکوکوس و پلانوکوکوس نیز می باشد. جنس استافیلوکوک دارای بیش از ۲۷ گونه و ۷ تحت گونه است و شایع ترین گونه آن که اغلب عامل بیماری استافیلوکوکی می باشد، بنام استافیلوکوک طلایی است.^۱ استافیلوکوک گروه بزرگی از باکتری ها در پوست و غشای مخاطی پستانداران هستند. این باکتری ها روی سطح پوست سر و صورت بصورت میکروکلونی بوده، مجرای خروجی گوش، بخش قدامی سوراخ های بینی، نواحی مرطوب و چین دار پوست، محل های مناسب استقرار استافیلوکوکها هستند. سوراخ های بینی و ناحیه پرینه از عمده ترین مراکز استقرار استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیس می باشد. استافیلوکوکوس اورئوس، مهمترین عامل بیماریزایی انسان محسوب می گردد که سویه های مولد کوآگولاز را استافیلوکوکوس اورئوس در نظر گرفته و دارای فعالیت آنزیمی و توکسینی وسیعی می باشد که برخلاف دیگر استافیلوکوک ها قند مانیتول را تخمیر کرده و همولیز کامل دارد.^۲ استافیلوکوک ها گروهی از پروتئینهای سطح سلولی را دارند که به عنوان ادhezین عمل می کنند و به پروتئینهای ماتریکس خارج سلولی مثل: فیبرونکتین، ویترونکتین، فیبرینوژن، لامینین، سیالوپروتئین های استخوان، ترومبوسپاندین، الاستین، کلاژن های نوع IV، VII، متصل می شوند. در برخی از این باکتری ها، لایه پپتیدوگلیکان کاملاً از بین رفته و در برخی نیز هنوز بخش های کوچکی از آن باقی مانده است. اشکال L، در باکتری های 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 سلولهای بزرگ با سیتوپلاسم دانه دار می باشند.^۳

^۴ بیوفیلیم در استافیلوکوکها از ترکیبات خارج سلولی است که به مقادیر متنوعی در همه آنها تولید می شود. بیوفیلیم ها رابطه تنگاتنگی با عوامل ژنتیکی، گونه، شرایط رشد دارند. مهمترین سویه های استافیلوکوکی تولیدکننده بیوفیلیم: استافیلوکوک اپیدرمیدیس، استافیلوکوک کاپیتیس زیر گونه اوره کاپیتیس، استافیلوکوک کاپیتیس زیر گونه کاپیتیس، استافیلوکوک هومینیس، استافیلوکوک همولیتیکوس، استافیلوکوک وارنری می باشد.^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 بیوتیک های مختلف متفاوت بوده و هر دسته دارویی مکانیسم مقاومت مخصوص به خود را دارد.^۷ اولین مورد MRSA در اواسط دهه 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 در ICU بود. اختلاقی 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 می باشد.^{۸،۹} در نوع مقاومت به متی سیلین از هیچ یک از بتالاکتام ها نباید استفاده کرد زیرا که تاثیری روی میکروارگانیزم 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 می شود. برای تشخیص این نوع از میکروارگانیزم ها می توان از آنتی بیوگرام به روش MIC استفاده کرد و یا می توان توسط PCR، ژن *mecA* را شناسایی کرد و داروی انتخابی آنها ونکومایسین و یا تیکوپلانیل (گلیکوپپتیدها) هستند.^{۱۰} در این پژوهش سعی شده تا الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، بیوفیلیم

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 بی‌هوای مثل تیوگلیکولات رشد خوبی دارند.

آزمایش دیسک دیفیوژن

محیط کشت مورد استفاده مولر هیتون آگار (مرک-آلمان) بوده که طبق دستور العمل کارخانه سازنده تهیه و سپس PH آن بین ۷/۴ - ۷/۲ 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 هیتون آگار کشت خطی داده شد و بعد از ۱۵ دقیقه دیسکها با فاصله ۲۲ mm از همدیگر و ۱۶ mm از جداره پلیت در روی محیط کاشته شد. بعد از ۱۵ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸-۲۴ 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 تأیید شود^{۱۱}.

آزمون E-TEST

جهت انجام این آزمون، همچون آزمون کربی - بائر، از محیط مولر هیتون 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 ۱۸-۲۴ ساعت انکوبه شد. ملاک تفسیر و مهار آنتی بیوتیک نقطه ای است که هیچ کلنی

و اشکال L استافیلوکوک های کوآگولاز 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 ۴۳۷ نمونه بالینی که از بیمارستان مهرآیین تهران و سایر بیمارستان های درمانی در طول ۶ 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 و LPM broth مورد بررسی قرار گرفت^{۱۱}. نمونه ها شامل کشت خون (۸۴ نمونه)، ادرار (۵۸ نمونه)، عفونتهای زخم (۷۳ نمونه)، مایع مغزی نخاعی (۴۲ نمونه) آبسه (۷۹ نمونه) خلط (۵۲ نمونه) پوست (۴۹ 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٪ تمک) و رشد کلنی زرد و همچنین تست مقاومت به باسیتراسین انجام گرفت (قطر هاله کمتر از ۱۰ mm برابر با مقاوم)^{۱۱}.

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 ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C ابتدا مایع موجود در داخل ظروف شیشه ای در شرایط استریل خالی شده و ظرف درب دار محتوی پرلها ذخیره شد. تریپتیکاز سوی آگار در کشت‌های اولیه و پاساژهای بعدی / استافیلوکوک های

باکتری رشد ننماید^{۱۱}. این تست به گونه ای است که به طور همزمان قطر هاله و MIC مربوط به آن آنتی بیوتیک به طور همزمان قرائت شده که بر حسب میلی متر و باجدول NCLSI ۲۰۱۳ مقایسه گردید. ضمناً 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 می دهد. 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 ۴۵ 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 ۴۵ الی ۵۰ درجه سانتی گراد باشد. سرم اسب در شیشه های دریچ دار استریل و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری می گردد. 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 پلیت های با چاهکهای پلی استیرنی صورت می گیرد و بررسی توانایی جدایی 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^{۱۲}. جدایه ها پس از کشت در TSB به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند از هر کدام از ایزوله ها تهیه گردید و تمام چاهک ها در یک پلیت ۹۶ خانه ای با ۲۰۰ میکرولیتر از محیط پر شدند ($10^4 \times 1/5$ CFU/well). به هر یک از چاهک ها ۲۰۰ میکرولیتر از استوک آنتی بیوتیکی و هر کدام از دو آنتی بیوتیک در حداکثر غلظت (پنی سیلین ۳۲ml/gu و سیپرو فلوکساسین ۶۴ml/gu) ریخته شد و رقت سازی به صورت سریالی انجام گردید. به مدت ۲۴ 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 ها ۱۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲٪ اضافه و پس از ۲۰ دقیقه پلیت ها 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 خانه ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از الیزا ریدر اندازه گیری شد (با ۳ تکرار). ضمناً از کنترل منفی (بدون سوسپانسیون آنتی بیوتیک) و کنترل مثبت (ATCC-25923) استفاده شد و توانایی تشکیل جذب نوری در ۴ ساعت ثبت گردید.

OD = میزان جذب نوری

ODC = میزان جذب نوری کنترل منفی

ODC > OD = عدم اتصال

ODC < 4 × ODC < 2 × ODC = متوسط

ODC < 2 × ODC < ODC = ضعیف

OD < 4 × ODC = قوی و در انتها درصد کاهش بیو فیلم بواسطه

آنتی بیوتیک ها را می توان از طریق جذب نوری چاهک تیمار شده، شاهد، کنترل طبق فرمول زیر بدست آورد.

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

C = میانگین جذب نوری چاهکهای کنترل B = میانگین جذب

نوری چاهکهای شاهد T = میانگین جذب نوری چاهکهای تیمار شده.

نتایج

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

در این مطالعه نتایج حاصل از بررسی ۴۳۷ مورد از آلودگیهای استافیلوکوکی کوآگولاز مثبت و منفی به روشهای مختلف در جدول ۱ آورده شده 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	۶۷	۴۳	۲۴
زخم	۵۶	۳۹	۲۷
ادرار	۴۹	۳۳	۱۶
پوست	۳۷	۲۱	۱۶
خلط	-	-	-
CSF	۳۱	۱۹	-
آبسه	۶۲	۵۸	۶

جدول ۲: نتایج حاصل از آزمایش دیسک دیفیوژن بر حسب میلی متر بر روی سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC۲۵۹۲۳

آنتی بیوتیک ها	محتویات دیسک	قطر هاله استاندارد NCCLS (mm)	نتیجه آزمایش ها (mm)
اگزاسیلین	mg ^۱	۱۸-۲۴	۲۱
سیپروفلوکساسین	mg ^۵	۲۲-۳۰	۲۶
پنی سیلین	mg ^{۱۰}	۲۷-۳۷	۳۰
اریترومایسین	mg ^{۱۵}	۲۲-۳۰	۲۴
تتراسایکلین	mg ^{۳۰}	۲۴-۳۰	۲۷
آمیکاسین	mg ^{۳۰}	۲۰-۲۶	۲۲
جنتامایسین	mg ^{۱۰}	۱۹-۲۷	۲۵

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

نتیجه آزمایش آنتی بیوتیک	حساس		نیمه حساس		مقاوم		جنس
	بالینی	مسمومیت غذایی	بالینی	مسمومیت غذایی	بالینی	مسمومیت غذایی	
	اورئوس	اپیدرمیس	اورئوس	اپیدرمیس	اورئوس	اپیدرمیس	
استافیلوکوکوس	-	-	-	-	-	-	
پنی سیلین	-	-	-	-	-	-	
اگزاسیلین	۴	۴	۶	۳	۱۳	۸	۹
جنتامایسین	۹	۳	۷	۵	۶	۴	۵
تتراسایکلین	۷	۲	۸	۵	۶	۵	۴
اریترومایسین	۲	-	۹	۲	۱۰	۱۰	۸
سیپروفلوکساسین	۶	۵	۲	۸	۱۰	۳	۸
آمیکاسین	۹	۳	۶	۸	۲	۲	۱۰

جدول ۴: نتایج حاصل از آزمایش E-TEST بر اساس قطر هاله بر حسب میلی متر

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

نتایج آزمون E-TEST با توجه به محدود بودن نوارهای مذکور انجام این آزمایش فقط بر روی تعداد محدودی از نمونه های استافیلوکوک بالینی صورت گرفت (برای هر آنتی بیوتیک ۵ نوار) (جدول ۴). 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 ماکرودایلوژن: 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 دایلوژن و با

استفاده از آنتی بیوتیکهای پنی سیلین و سیپروفلوکساسین انجام گرفت و نتایج مندرج در جدول ۵ مشاهده می شود. لازم به ذکر است که مطابق جدول NCCLS برای آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین برای حالت مقاوم ≥ 4 و برای حالت نیمه حساس مساوی ۲ و برای حالت حساس $1 \leq (\mu g/ml)$ و برای سویه استافیلوکوکوس اورئوس در نظر گرفته می شود و برای آنتی بیوتیک پنی سیلین برای حالت مقاوم $\geq 0/5$ و حساس $0/25 \leq$ در نظر گرفته می شود. 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 ماکرودایلوژن بر حسب میکروگرم بر میلی گرم

حساسیت آنتی بیوتیکی		حساس (S)		نیمه حساس (I)		مقاوم (R)	
بالینی	اپیدرمیس	بالینی	اپیدرمیس	بالینی	اپیدرمیس	بالینی	اپیدرمیس
اورئوس	اورئوس	اورئوس	اورئوس	اورئوس	اورئوس	اورئوس	اورئوس
منبع	اورئوس	اپیدرمیس	اورئوس	اپیدرمیس	اورئوس	اپیدرمیس	اورئوس
جنس استافیلوکوکوس	-	۱	۱	۱	۵	۳	۱۹
پنی سیلین	-	۱	۱	۱	۵	۳	۱۹
$0/25 < \text{حساس} (\mu g/mg)$	-	۱	۱	۱	۵	۳	۱۹
نیمه حساس $0/25$	-	۱	۱	۱	۵	۳	۱۹
$0/5 \geq$ مقاوم	-	۱	۱	۱	۵	۳	۱۹
سیپرو فلوکساسین ۱	-	۱	۱	۱	۵	۳	۱۹
$< \text{حساس} (\mu g/mg)$	۳	۵	۵	۷	۴	۶	۱۳
نیمه حساس ۲	۳	۵	۵	۷	۴	۶	۱۳
≥ 4 مقاوم	۳	۵	۵	۷	۴	۶	۱۳

بحث و نتیجه گیری

نقش این باکتری در ایجاد باکتری، سپتی سمی، اندوکاردیت حاد و عفونت هایی که منشاء خونی دارند (بویژه عفونت های مزمن یا عود کننده پس از قطع مصرف دارو) ما را بر آن داشت تا پایداری یا ناپایداری اشکال L استافیلوکوکوس اورئوس را که در غلظت های مختلف وانکومایسین القا شده اند بررسی نماییم. در محیط های LPM broth، علاوه بر باکتریهای مرحله L، باکتریهای عادی نیز قادر به رشد و تکثیر می باشند و همانند اشکال L، سبب ایجاد کدورت و تغییر رنگ محیط از قرمز به نارنجی یا زرد می شوند. باید به این نکته نیز توجه داشت که باکتریهای عادی این کار را در مدت ۴ یا حداکثر ۴۸ ساعت انجام می دهند، ولی اشکال L پس از ۳ الی ۷ شبانه روز قادر به انجام این کار می باشند. در این آزمایش نیز ایجاد کدورت و تغییر رنگ در محیط LPM broth، در فاصله روزهای سوم تا ششم صورت می گرفت. از آنجا که برخی از باکتری ها نظیر استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوکوس فکاليس تا چند دهه گذشته نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک ها بویژه انواع پنی سیلین ها حساس بوده اند، امروزه مقاومت قابل توجهی در برابر این آنتی بیوتیک ها یافته و عفونت های مزمن، عود کننده و تقریباً غیر قابل درمانی از این باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک می باشد. مطالعه و تحقیق بر روی نحوه القای اشکال L در مجاورت غلظت های مختلف آنتی بیوتیک های موثر بر سنتز دیواره سلولی امری ضروری به نظر می رسد. جداسازی اشکال L باکتریها از مایعات و بافت های مختلف بدن انسان و برخی از حیوانات سالم یا 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 ماندن اشکال L برخی از باکتریها در داخل گلبولهای سفید بیگانه خوار، الگوهای فیزیولوژی، ساختمانی، متابولیکی و حساسیت دارویی اشکال L که آنها را تا حد زیادی از باکتریها عادی و دیواره دار متمایز می سازد، همگی از جمله مواردی هستند که بر اهمیت مطالعه و تحقیق بیشتر بر روی خصوصیات مختلف اشکال L علیرغم مشکلات خاصی از قبیل

کشت، جداسازی، تشخیص و یا نگهداری طولانی مدت این اشکال تاکید می نمایند. با وجود تمامی تحقیقاتی که طی چندین دهه بر روی این باکتریها صورت گرفته ولی هنوز اطلاعات ما در رابطه با نحوه تکامل و مراحل تکاملی این میکروارگانیسم ها، خصوصیات ژنتیکی آنها، واکنش متقابل بین آنها و سیستم ایمنی میزبان، چگونگی دخالت آنها در مزمن شدن و یا عود عفونت ها و نظایر آن بسیار اندک می باشد^{۱۳}. در مطالعه ای در ایران تعداد ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران بستری در بیمارستانهای شهر تبریز در مدت ۱۱ ماه ایزوله شد. تمامی سویه ها به کمک تستهای میکروسکوپی، کوآگولاز، کاتالاز، Dnase تعیین هویت شد و سپس حساسیت سویه ها در برابر وانکومایسین به روش دیسک آگار دیفیوژن و Minimum inhibitory concentration (MIC) آنها باروش E-test تعیین شد و نتایج باهم مقایسه گردید^{۱۴}. Sakoulas و همکاران در سال ۲۰۰۴ برای شناسایی سویه های دارای مقاومت ناهمگون نسبت به وانکومایسین از روش آنالیز جمعیتی استفاده کردند. از ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شده، ۹۸٪ آنها به وانکومایسین حساس و دامنه MIC سویه های آزمایش شده بین ۱/۵ g/ml تا ۳ g/ml بود. فقط دو مورد ایزوله با 4 μg/ml MIC به دست آمد که مطالعات بعدی باروش آنالیز جمعیتی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس دارای مقاومت ناهمگون نسبت به وانکومایسین در این ایزوله ها با MIC ≥ ۸ g/ml بود^{۱۵}. در تست حساسیت ۱۱ نوع آنتی بیوتیک با روش دیسک آگار دیفیوژن نیز حساسیت سویه ها بدین ترتیب بود:

وانکومایسین (۱۰۰٪)، ریفامپین (۱۰۰٪)، سپروفلوکساسین (۱۰۰٪)، کوتریموکسازول (۱۰۰٪)، سفالوتین (۷۴٪)، متی سیلین (۶۲٪)، کلرامفنیل (۴۴٪)، کلیندامایسین (۴۳٪)، جتتامیسین (۳۶٪)، اریترومایسین (۳۱٪) و پنی سیلین G (۱٪). نتایج مطالعه نشان داد که از وانکومایسین هنوز می توان در درمان استافیلوکوکوس اورئوس استفاده کرد ولی باتوجه به اینکه در این میان فقط ۱۰۰ سویه بالینی بررسی شد مواجهه با دو سویه دارای مقاومت ناهمگون نسبت به ونکومایسین (۲٪) بود و نیز ظهور سویه های استافیلو کوکوس اورئوس با مقاومت حد واسط و مقاومت کامل در برخی از کشورهای جهان انجام تستهای حساسیت به روش و تعیین

MIC قبل از شروع درمان، جهت مشخص شدن حساسیت سویه های مورد آزمایش در مقابل وانکو مایسین، در ردیابی سویه های مقاوم احتمالی و کاهش بروز مقاومت های 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 اورئوس های مقاوم به متی سیلین (MRSA) به وسیله الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها (Antibiogram) پرداختند. حداقل غلظت مهار (MIC) نشان دهنده میزان غلظت ماده ضد میکروبی است که به طور کامل از رشد ارگانیسم ممانعت میکند. به منظور تعیین MIC (CLOXACILLIN) از ۱۰ MRSA که قبلا از ۴۰ نمونه ایزوله های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) تشخیص داده شده بود استفاده شد.^{۱۶} Afroz و 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 ۲۰۰۶ تا ژوئن ۲۰۰۷ انجام شد، MIC (CLOXACILLIN) برای ۵ سویه از MRSA ۳۲ (میکروگرم / میلی لیتر)، برای ۱ سویه ۱۲۸ (میکروگرم / میلی لیتر) بود و برای ۴ سویه دیگر MRSA بالای ۱۲۸ (میکروگرم / میلی لیتر) بود. تست حساسیت ضد میکروبی از ارگانیسم های جدا شده با روش دیسک دیفیوژن انجام شد. در تست حساسیت آنتی بیوتیکی، سویه های MRSA در برابر آنتی بیوتیک های penicillin, amoxicillin, cloxacillin, amoxicillin مقاومت ۱۰۰ درصدی نشان دادند. صد در صد حساسیت، MRSA در برابر vancomycin, ciprofloxacin, erythromycin, fusidic acid, rifampicin مشاهده شد.^{۱۷، ۱۸} Hibma و همکاران عفونت و حذف از فرم L لیستریا مونوسیتوز با باکتریوفاژ پرورش یافته را بررسی نمودند. پرورش فاژ برای تولید یک باکتریوفاژ خاص که برای فرم L مونوسیتوزن مورد استفاده قرار گرفت. فاژ پرورش یافته با خانواده فاژ پرورش نیافته از نظر فعالیت لایتیک و ویژگی های خاص مقایسه شد. آن همچنین توانایی برای جلوگیری از فرم L 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 می باشد. (MRSA) اختصار Methicillin resistant staphylococcus aureus می باشد. این مطالعه مقاومت MRSA را در مقابل داروهای مختلف نشان می دهد. 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 ۱۰۰ درصد مقاومت نشان دادند. پس از اندازه گیری حداقل بازدارنده MIC کمک مهمی در تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی به باکتری می نماید.^{۱۹} Birmingham و همکاران در سال ۲۰۰۸ به بررسی اشکال Form L- در ارتباط با مایکو پلاسما پرداختند. یک برنامه دوساله جهت بررسی امکان کشت L فرم به طور معمول و تعیین تاثیر چنین برنامه ای آغاز شد. در رابطه با تعداد نمونه ها، 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 نمونه های 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 می شود این روش برای آن دسته از بیمارانی که سابقه طولانی از عفونت های دستگاه ادراری دارند و تلاش های دیگر برای درمان بیمار با شکست مواجه شده استفاده شود.^{۲۰-۲۲} طی مطالعه ای که کاوسی نژاد در بین کارکنان بیمارستان های شهر بابل انجام داد حالت ناقلی استافیلوکوک اورئوس در قسمت قدامی بینی کارکنان در حدود ۴۴/۳٪ بوده و این رقم در کارکنان آزمایشگاه ها و بخش بیماری های عفونی بیش از سایر بخش ها (۶۶٪) گزارش گردیده است. ولی در مطالعه ای که در سال ۱۳۶۵ در کارکنان بعضی از بیمارستانهای آموزشی دانشگاه اصفهان انجام شد در کشت نمونه سواب ناحیه قدامی بینی و گلو ۴۰/۵ 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

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 ضد عفونی 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 اشیشیاکلی 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 (ایترکنش) 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 تیکوژلانیل) 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

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 اکثراً نسبت به کلوکساسیلین، حساس بوده اند که این رقم در شهر گرگان از تهران نیز کمتر بوده است.^{۳۳} 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 می دهد.^{۲۵، ۲۶} همچنین باکتری نسبت به آموکسی سیلین، سفالوتین، اریترومایسین، تتراسیکلین، گلوگزاسیلین، پنی سیلین، سولفامتوکسازول، سیپروفلوکساسین، ونکومایسین، داکسی سیکلین، سفتریاکسون، حساسیتی کمتر از ۵۰٪ از خود نشان داده است. ضمناً 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 اگراسیلین، تمامی موارد نسبت به پنی سیلین و ۶۵٪ نسبت به تری متوپریم، مقاوم بوده و کلیه موارد مقاوم به اگراسیلین، نسبت به وانکومایسین نیز مقاوم بوده اند.^{۳۶} 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 اگراسیلین 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 استاندارد 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 ثالثاً این ارگانیسم ها در

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

Reference

- Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 27 E: McGraw Hill Professional; 2015.
- Cadena J, Sreeramaju P, Nair S. Diagnostic microbiology and infectious disease. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;74(1):16-21.
- Graham PL, Lin SX, Larson EL. A US Population-Based Survey of Staphylococcus aureus Colonization Epidemiology of S. aureus. Ann Intern Med. 2006;144(5):318-25.
- 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.
- Singhal D, Foreman A, Bardy JJ, Wormald PJ. Staphylococcus aureus biofilms. The Laryngoscope 2011;121(7):1578-83.
- Walker R, Buckley M. Probiotic microbes: the scientific basis. 2006.P:269-96.
- 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.
- García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, et al. Methicillin-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.
- 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.
- 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.
- Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology-E-Book: Elsevier Health Sciences; 2014.
- 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.
- Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T. Jawetz, Melnick, Adelberg Medical Microbiology: Placebo doo; 2015.
- 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.
- 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.
- 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.
- Afroz S, Kobayashi N, Nagashima S, Alam MM, Hossain A, Rahman MA, et al. Genetic characterization of Staphylococcus aureus isolates carrying Pantone-Valentine leukocidin genes in Bangladesh. Jpn J Infect Dis. 2008;61(5):393-6.
- 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.
- 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.
- 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.
- Bowman JP, Bittencourt CR, Ross T. Differential gene expression of Listeria monocytogenes during high hydrostatic pressure processing. Microbiol. 2008;154(2):462-75.
- Errington J. L-form bacteria, cell walls and the origins of life. Open biology 2013;3(1):120143.
- Kavoosinezhad F, Fattahi E, Bakhtiari N. Antibiotic

- 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: Tabriz 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 Hospital 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, Rüdén 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, Donnelly 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.

Kumarss Amini¹, Behrooz Shojaei ^{2*}, Ehsan Estabraghi³

¹ Associated Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

² Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.

³ Faculty Member, Department of Veterinary Medicine, Shahrabak Branch, Islamic Azad University, Shahrabak, 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*, Antibigram, ELISA test, Biofilm

*Corresponding Author:

Assistant Professor,
Department of Microbiology,
School of Basic Sciences,
Arak Branch, Islamic Azad
University, Arak, Iran.

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