

بررسی تأثیر اکسید نیتریک بر سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در تهران در سالهای ۱۴۰۲- ۱۴۰۰

فاتح رحیمی^{۱*}، ساناز خاشعی^۲

۱- دکتری تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان

۲- دانشجوی دکتری تخصصی باکتری شناسی، گروه میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

*نشانی برای مکاتبه: f.rahimi@sci.ui.ac.ir

پذیرش برای چاپ: پاییز ۱۴۰۳

دریافت مقاله: تابستان ۱۴۰۳

چکیده

سابقه و هدف: نقش مهم استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در ایجاد عفونتهای دستگاه ادراری به اثبات رسیده است. تشکیل بیوفیلم مسئول بقا و ماندگاری این سویه ها در سیستم ادراری هستند که می تواند منجر به عود عفونت شود. هدف مطالعه حاضر، سنجش اثر غلظتهای مختلف اکسید نیتریک بر بیوفیلم سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اوروپاتوژنیک جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در تهران در سالهای ۱۴۰۰-۱۴۰۲ بوده است.

روش کار: در مدت ۲ سال در مجموع ۳۱۸ ایزوله مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در یک بیمارستان مرجع در شهر تهران جمع آوری گردید و با استفاده از آزمون PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *nuca* مورد شناسایی قرار گرفتند. مقاومت این سویه ها نسبت به متی سیلین بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی و با ترکیبی از روشهای غربالگری آگار و انتشار دیسک تعیین شد. آزمونهای کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت برای ارزیابی توانایی تشکیل بیوفیلم این سویه ها، استفاده گردید. فراوانی ژنهای مؤثر در تشکیل بیوفیلم شامل *icaA*، *icaD*، *clfA*، *fnbA* و *cna* با استفاده از تست های PCR جداگانه تعیین و همچنین پراکندگی *SCCmec* تایپهای مختلف در میان این سویه ها با آزمون multiplex-PCR بررسی شد. مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های مولد بیوفیلم نسبت به ۱۴ آنتی بیوتیک بر اساس دستورالعملهای CLSI مورد سنجش قرار گرفت. همچنین، تأثیر غلظتهای ۳۰ میکرومولار و ۱۲۵ نانومولار سدیم نیتروپروساید بر مهار تشکیل بیوفیلم و تخریب بیوفیلم تشکیل شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: مجموعاً ۲۹۷ سویه (۹۳ درصد) به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد شناسایی قرار گرفتند، که در این میان ۳۰ درصد (۹۰ سویه) نسبت به متی سیلین مقاوم بوده و واجد ژن *mecA* بودند. همچنین، ۷۲ درصد سویه ها قادر به تشکیل بیوفیلم بودند و فراوانی ژنهای *icaA*، *icaD*، *clfA*، *fnbA* و *cna* نیز به ترتیب ۸۶، ۸۹، ۷۵، ۷۲ و ۵۸ درصد بود. علاوه بر این، ۲۶ و ۷۴ درصد سویه ها به ترتیب اکتسابی از جامعه (واجد *SCCmec* تایپهای IV و V) و بیمارستان (واجد *SCCmec* تایپهای I-III) بودند و مقاومت نسبت به پنی سیلین، سیپروفلوکساسین، اریترومايسين، کلیندامایسین، جنتامایسین، تتراسایکلین و ریفامپین نیز به ترتیب ۱۰۰، ۷۴، ۷۲، ۶۸، ۶۶، ۶۳ و ۶۲ درصد بود. علاوه بر این، غلظت ۳۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید تأثیر قابل ملاحظه ای بر تشکیل و تخریب بیوفیلم داشت.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه مؤید شیوع سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری در شهر تهران است که در صورت عدم اجرای برنامه های پیشگیری و کنترل عفونت مناسب می تواند به یک معضل بهداشتی مهم در کشور ما مبدل شود. از سوی دیگر، غلظت ۳۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید به طور چشمگیری بر تشکیل بیوفیلم و تخریب بیوفیلم ناشی از این سویه ها مؤثر بود و بنابراین می تواند به عنوان راهکاری جهت جلوگیری از انتشار این سویه ها در سیستم های بهداشتی و درمانی مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: عفونت دستگاه ادراری، بیوفیلم، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، سدیم نیتروپروساید، اکسید نیتریک

مقدمه

در سراسر جهان عفونت دستگاه ادراری به عنوان شایعترین عفونت باکتریایی در انسان و به ویژه در خانمها مطرح بوده به طوری که بیش از نیم از خانم ها در طول زندگی خود تجربه ابتلا به این نوع عفونت را دارند (۱). اغلب، این عفونت ها در مراحل اولیه بسیار شدید به نظر نمی رسد، اما وجود عواملی نظیر بیوفیلها، احتباس ادرار ناشی از انسداد مجرا و سوندهای ادراری می تواند به طور قابل توجهی سبب پیشرفت عفونت ادراری شود (۲، ۳).

گونه های مختلف جنس *استافیلوکوکوس* از جمله *پیدرمیدیس* و *اورئوس* و به ویژه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین، به عنوان عوامل اصلی ایجاد عفونتهای مرتبط با بیوفیلیم شناخته شده اند (۴، ۵). اتصال اولیه این باکتری ها به سطوح زنده (عروق خونی، استخوانها یا مفاصل) یا غیرزنده (پروتزها و سوند) وابسته به حضور پروتئین هایی است که به عنوان اجزای سطحی میکروبی شناسایی مولکولهای ماتریکس چسبنده^۱ شناخته می شوند (۶). در *استافیلوکوکوس اورئوس* عامل کلامپینگ^۲ A (ClfA) و B (ClfB) پروتئینهای اصلی این مجموعه بوده که با اتصال به فیبرینوژن، به عنوان میانجی در اتصال اولیه این باکتری به سطوح مختلف دخیل هستند. از سایر مولکولهای این کمپلکس سطحی می توان به سیالوپروتئین متصل به استخوان^۳ و همچنین آدهسین کلاژن^۴ اشاره نمود که به ترتیب در اتصال *استافیلوکوکوس اورئوس* به ماتریکس خارج سلولی و کلاژن نقش دارند (۷). کلونیزه شدن *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین یک گام بسیار مهم در گسترش عفونتهای فعال ناشی از این باکتری و یک عامل کلیدی جهت گسترش آن در مراکز درمانی محسوب می شود. بیوفیلها به عنوان عامل اصلی کلونیزه شدن *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین و متعاقبا چالشهای پیش رو در ریشه کن کردن این سویه ها نقش دارند (۸). مقاومت شدید بیوفیلیم نسبت به آنتی بیوتیکها و سایر ترکیبات ضد میکروبی، یک پدیده چندعاملی است که بسته به کلاس آنتی بیوتیک استفاده شده، شامل سازوکارهای مختلفی از قبیل انتشار ناقص آنتی بیوتیک، بی تفاوتی دارو، بیان

سازوکارهای ژنتیکی مختص بیوفیلیم و حضور سلولهای مقاوم است (۹). برای مثال، تأثیر یک آنتی بیوتیک پس از جذب شدن به ماتریکس خارج سلولی توسط میانکنشهای الکتریکی با پلیمرهای بیوفیلیم، کاهش پیدا می کند. از طرف دیگر نفوذ تأخیری آنتی بیوتیک در بیوفیلیم ممکن است تبعات فنوتایپی مهمی به همراه داشته باشد. به عنوان مثال، باکتری از نظر فیزیولوژی می تواند نسبت به آنتی بیوتیکها مقاومت نشان دهد. در لایه های عمیق بیوفیلیم، به دلیل وجود مقادیر متفاوت مواد غذایی، مواد زائد، pH، اکسیژن و فرآورده های جانبی حاصل از سوخت و ساز باکتری در بیوفیلیم، شرایط فیزیکی و شیمیایی خاصی حاکم است. از آنجایی که بیشتر آنتی بیوتیکها در مقابل باکتریهای فعال از لحاظ سوخت و سازی و در حال رشد عملکرد بهتری دارند؛ در شرایط بدون اکسیژن^۵ و بدون غذا در لایه های عمقی کارایی خود را از دست می دهند (۱۰). با توجه به مقاومت دارویی فزاینده و عدم کارایی مناسب آنتی بیوتیکهای موجود، توسعه ترکیبات دارویی و روشهای درمانی نوین امری ضروری است. از طرفی توسعه آنتی بیوتیک های نوآورانه به دلیل نیاز به فرآیندهای وقت گیر، هزینه های بالا و ظهور سریع مقاومت در هنگام معرفی هر آنتی بیوتیک جدید بسیار چالش برانگیز است. با توجه به این چالش ها، تعداد بسیار محدودی داروی کاندید جدید جهت مقابله با عفونت های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به دارو وجود دارد که بسیاری از این داروها انواع تغییر یافته ای از کلاس های قبلی هستند که امکان مقاومت متقاطع به آنها نیز وجود دارد. برای غلبه بر مشکلات توصیف شده، تحقیقات کنونی بر استفاده از مکمل های دارویی دارای اثرات سینرژیسمی با آنتی بیوتیکهای موجود متمرکز شده است. این مکمل ها مولکول هایی هستند که می توانند به طور مستقیم با هدف قرار دادن مکانیسم های مقاومت و یا به طور غیر مستقیم با مهار فعالیت پمپ های افلاکس و مسیرهای سیگنالینگ سبب افزایش خاصیت آنتی باکتریال آنتی بیوتیک ها گردند (۱۱). از جمله این مکمل های درمانی می توان به استفاده از اکسید نیتریک که واجد تأثیر ضد میکروبی و ضد بیوفیلیمی بالا و اثرات جانبی پایین است، اشاره نمود.

اکسید نیتریک یک مولکول گازی است که توسط قلب وارد جریان خون شده و یکی از مهمترین عملکردهای آن در بدن

^۱ Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs)
^۲ Clumping factor (Clf)
^۳ Bone sialo-binding protein (Bbp)
^۴ Collagen adhesin

^۵ Anoxia

استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه های ادراری بیماران بستری (۲۳۱ سویه، ۷۳ درصد) و سرپایی (۸۷ سویه، ۲۷ درصد) در یک بیمارستان مرجع اورولوژی در شهر تهران توسط آزمایشگاه بیمارستان مورد نظر جداسازی گردید. تمامی بیماران به دلیل مشکلات کلیوی و مجاری ادراری با علائم عفونت ادراری مانند تکرر ادرار، سوزش در هنگام دفع، کدورت ادرار و تب به بیمارستان مربوطه مراجعه کرده بودند و بعضاً واجد سوند در مجرای ادراری بوده و یا در نوبت پیوند کلیه قرار داشتند. همچنین، ۱۹۵ ایزوله (۶۱ درصد) از نمونه های ادراری خانمها و ۱۲۳ ایزوله (۳۹ درصد) نیز از نمونه های ادراری آقایان جداسازی شدند. در این مطالعه هیچگونه نمونه گیری توسط نویسندگان مقاله انجام نگرفت و تنها پلیتهای کشت به صورت هفتگی جمع آوری و پس از نگهداری در یخچال با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه اصفهان ارسال شدند. در آزمایشگاه، در ابتدا تمامی ایزوله ها بر روی محیط ژلوز کلمبیا (Merck, Germany) کشت داده شدند و سپس تمامی ایزوله ها با آزمون PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *nuca* مورد شناسایی قرار گرفتند (۱۸). در نهایت، تمامی سویه های مورد تأیید در لوله های کرایو واجد محیط مغذی (نوترینت برات^{۱۵}، Merck, Germany) و گلیسرول و در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شدند.

بررسی مقاومت به متی سیلین

به منظور انتخاب سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در این مطالعه از آزمون غربالگری آگار^{۱۶} بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی^{۱۷} استفاده گردید (۱۹). برای این منظور از محیط کشت ژلوز مولر هینتون (Merck, Germany) واجد ۲ درصد نمک و ۶ میکروگرم/میلی لیتر پودر اگزاسیلین (Sigma-Aldrich, GmbH, Germany) استفاده شد. از کشت خالص و تازه هر سویه باکتریایی یک کلنی بر روی محیط ژلوز مولر هینتون کشت داده شد و سپس پلیتهای به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سویه هایی که بر روی محیط واجد آنتی بیوتیک رشد کرده بودند، انتخاب شدند و سپس مقاومت هر سویه استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به دیسک

تنظیم جریان خون است (۱۲). همچنین اکسید نیتریک توسط آنزیم القایی^{۱۸} اکسید نیتریک سنتاز به عنوان یکی از سازوکار-های دفاع ضد میکروبی میزبان، تولید می شود (۱۳)، به گونه ای که افزایش فعالیت این آنزیم در مثانه و ادرار افراد مبتلا به عفونت ادراری گزارش شده است (۱۴). غلظتهای اکسید نیتریک که توسط سلولهای بیگانه خوار تولید می شود، باکتری کش بوده و به طور مؤثری در دفاع ضد میکروبی حائز اهمیت می باشد (۱۳). در مطالعات پیشین، اثر اکسید نیتریک بر مهار و پراکندگی بیوفیلیم باکتریهای گرم منفی مانند سودوموناس آئروژینوزا^{۱۹}، سراسیا مارسسنس^{۲۰}، ویبریو کلرا، اشرشیا کلای و فوزوباکتریوم نوکلئاتوم^{۲۱} و باکتریهای گرم مثبت مانند استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و باسیلوس لیکنیفورمیس^{۲۲} همچنین سویه های بیماریزای واجد مقاومت چند دارویی و بیوفیلیمهای متشکل از چندین جنس و گونه باکتریایی گزارش شده است. در این مطالعات، طیف وسیعی از غلظتهای (میکرومولار-نانومولار) ترکیبات آزاد کننده اکسید نیتریک مانند سدیم نیتروپروساید^{۲۳}، نانوذرات آزادکننده اکسید نیتریک، S-نیتروزو-N-استیل پنیسیل آمین^{۲۴}، S-نیتروزوگلوکوتائون^{۲۵} و پرولی NONOate^{۲۶} در کاهش و تخریب بیوفیلیمها مؤثر بودند (۱۷-۱۵). بر این اساس، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر اکسید نیتریک بر سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلیم جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به یک بیمارستان مرجع در شهر تهران در سالهای ۱۴۰۰-۱۴۰۲ به انجام رسیده است.

مواد و روشها

جمع آوری و شناسایی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس

در مطالعه حاضر در یک بازه زمانی دو ساله از شهریور ۱۴۰۰ لغایت مرداد ۱۴۰۲ در مجموع ۳۱۸ ایزوله مشکوک به

Inducible^۱*Pseudomonas aeruginosa*^۲*Serratia marcescens*^۳*Fusobacterium nucleatum*^۴*Bacillus licheniformis*^۵Sodium nitroprusside (SNP)^۶S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP)^۷S-Nitrosoglutathione (GSNO)^۸Proli NONOate^۹Nutrient broth^۱Agar screening^۱Clinical and Laboratory Standards Institute^۱

($1.0 < OD_{570} \leq 0.2$)، بیوفیلیم ضعیف ($0.2 < OD_{570} \leq 0.5$) و بیوفیلیم منفی ($OD_{570} \leq 0.05$)، تقسیم بندی شدند.

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های مولد بیوفیلیم

جهت تعیین حساسیت سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلیم نسبت به ۱۴ آنتی بیوتیک مختلف معرفی شده توسط CLSI از محیط ژلوز مولر هینتون و روش انتشار دیسک استفاده گردید (۱۹). آنتی بیوتیکهای مورد استفاده در این مطالعه آزیترومایسین (۱۵ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، پنی سیلین (۱۰ واحد)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول ($25/1-23$ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، ریفامپین (۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، کینوپریستین-دالفوپریستین (۱۵ میکروگرم) لینزولاید (۳۰ میکروگرم)، مینوسایکلین (۱۵ میکروگرم) و نیتروفورانئوئین (۳۰۰ میکروگرم) (Liofilchem, Italy) بودند. همچنین به منظور تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد آنتی بیوتیک ونکومایسین از روش broth microdilution و بر اساس استانداردهای CLSI استفاده شد و حداقل غلظت ممانعت از رشد ونکومایسین برای سویه های مقاوم و واجد مقاومت بینابینی به ترتیب $16 \geq$ و ۸-۴ میکروگرم تعیین گردید.

آزمونهای مولکولی

استخراج DNA

در این تحقیق، استخراج DNA از تمامی ۳۱۸ ایزوله جمع آوری شده به روش جوشاندن و بر اساس پروتکل پیشین رحیمی و همکاران انجام گرفت (۲۱). به صورت خلاصه، یک لوپ از کشت تازه و خالص هر ایزوله باکتریایی در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل و پس انجام ورتکس، به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه ترموبلاک (HPN-24، پدیده نوژن پارس) جوشانده شد. سپس ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ در $g \times 13000$ انجام و در نهایت ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی به عنوان DNA الگو در انجام آزمونهای مولکولی استفاده شد.

آزمونهای PCR

شناسایی و تأیید سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس*

سفوکسی تین (۳۰ میکروگرم) به روش انتشار دیسک و بر اساس دستورالعمل CLSI تعیین گردید (۱۹). همچنین، حضور ژنهای *mecA* (۱۸) و *mecC* (۲۰) در میان سویه های مقاوم به متی سیلین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی تشکیل بیوفیلیم

پس از انتخاب سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین، جهت تعیین توانایی سویه ها در تشکیل بیوفیلیم، از دو روش کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت بر اساس دستورالعمل پیشین رحیمی و همکاران استفاده گردید (۵). در روش کیفی در ابتدا کلنی تازه و خالص هر سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین به صورت خطی بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو کشت داده شد و سپس سویه ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۲۴ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس سویه ها بر اساس تشکیل کلنی با رنگهای مشکی، قرمز تیره و قرمز روشن به ترتیب به سه دسته اسلایم مثبت، اسلایم مشکوک و اسلایم منفی تقسیم بندی و سویه های اسلایم مثبت و اسلایم مشکوک جهت بررسی بیشتر از طریق روش میکروتیتر پلیت انتخاب شدند. در آزمون کمی میکروتیتر پلیت ابتدا کشت باکتری در محیط آبگوشت تریپتیک سوی (Scharlau, Spain) واجد ۰/۲۵ درصد سوکروز تهیه و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، کدورتی معادل نیم مک فارلند از هر سویه تهیه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر سویه با غلظتی معادل یک میلیون CFU/ml در محیط آبگوشت تریپتیک سوی واجد سوکروز تهیه و به صورت سه تایی در چاهکهای پلیت ۹۶ خانه تلقیح و پلیتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از این مدت، محتویات چاهکها خالی شد و با استفاده از فسفات بافر سالین سه مرتبه شست و شوی هر چاهک انجام گرفت. برای رنگ آمیزی چاهکها از کریستال ویوله ۰/۳۶ درصد (Sigma-Aldrich, GmbH, Germany) به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. سرانجام محتویات چاهکها خالی و شست و شو با آب مقطر صورت گرفت و از ترکیب اتانول-استن (۲۰-۸۰) برای حل کردن رنگهای متصل به توده های چسبیده به دیواره چاهکها استفاده گردید. در نهایت، جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد. بر این اساس سویه ها به ۴ دسته بیوفیلیم قوی ($1 \geq OD_{570}$)، بیوفیلیم متوسط

CFU/mL در محیط آبگوشت تریپتیک سوی واجد سوکروز آماده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف سدیم نیتروپروساید به ۹۹۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی آماده شده اضافه و در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون به صورت سه تایی در چاهک های پلیت ۹۶ خانه تلقیح گردید. به عنوان کنترل های منفی (ODnc) و مثبت (ODc) به ترتیب از چاهک های واجد محیط آبگوشت تریپتیک سوی واجد سوکروز و ۱۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف سدیم نیتروپروساید، و چاهک های واجد سوسپانسیون باکتری و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و سپس محتویات پلیت ها تخلیه شده و سه مرتبه شست و شو با فسفات بافر سالین انجام گرفت. جهت رنگ آمیزی بیوفیل های تشکیل شده از کریستال ویوله ۰/۳۶ درصد استفاده شد و در نهایت پس از تخلیه و شست و شو با آب مقطر، جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت (ODt). به منظور بررسی اثر اکسید نیتریک بر تشکیل بیوفیل از فرمول زیر استفاده شد (۲۶):

$$= ([ODc-ODs] - [ODt-ODnc] / [ODc-ODs]) \times 100$$

درصد مهار تشکیل بیوفیل

بررسی اثر اکسید نیتریک بر تخریب بیوفیل

به منظور بررسی اثر غلظت های مختلف اکسید نیتریک بر تخریب بیوفیل تشکیل شده توسط سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از پروتکلی که پیشتر جهت تعیین تشکیل بیوفیل به روش میکروتیتر پلیت مطرح شد، استفاده گردید. بر این اساس، ۶ سویه مولد بیوفیل قوی، متوسط و ضعیف انتخاب شدند و به آن ها اجازه تشکیل بیوفیل در داخل چاهک ها داده شد. سپس محتویات چاهک ها تخلیه و ۲۰۰ میکرولیتر از دو غلظت ۳۰ میکروکولار و ۱۲۵ نانومولار سدیم نیتروپروساید به هر چاهک اضافه شد و سپس هر پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. پس از این مدت محتویات چاهک ها تخلیه و شست و شو با فسفات بافر سالین انجام گرفت و سپس جهت رنگ آمیزی از کریستال ویوله ۰/۳۶ درصد استفاده شد. پس از شست و شوی هر چاهک با آب مقطر، رنگبری با ترکیب اتانول-استن (۲۰-۸۰) انجام گرفت و در نهایت جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد. اثر تخریبی هر ترکیب بر بیوفیل تشکیل شده بر اساس فرمول زیر محاسبه شد (۲۶):

در این مطالعه، تمامی ایزوله های جمع آوری شده در آزمایشگاه بیمارستان با استفاده از آزمون های فنوتایپی مورد شناسایی قرار گرفته بودند و سپس جهت تأیید مولکولی این ایزوله ها از آزمون PCR و پرایمر اختصاصی ژن *nucA* (جدول ۱) بر اساس دستورالعمل پیشین رحیمی و همکاران استفاده شد (۲۲).

بررسی حضور ژن *mec* و *SCCmec* تایپینگ سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین

پس از انتخاب سویه های مقاوم به متی سیلین به روش های غربالگری آگار واجد اگزاسیلین و تأیید به روش انتشار دیسک سفوکسی تین، به منظور تعیین حضور ژن های *mecA* و *mecC* از آزمون های PCR جداگانه با پرایمر های اختصاصی هر ژن (جدول ۱) بر اساس برنامه های حرارتی که پیشتر معرفی شده بودند، استفاده شد (۲۰، ۲۲). سپس، سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد ژن *mec* انتخاب و بررسی حضور *SCCmec* تایپ های مختلف با استفاده از آزمون های multiplex-PCR (برای تایپ های I-V) با پرایمر های اختصاصی (جدول ۱) انجام گرفت (۲۳). همچنین، برای تأیید سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه، شناسایی ژن *pvl* بر اساس دستورالعمل پیشین صورت گرفت (۲۴).

تعیین ژن های مرتبط با تشکیل بیوفیل در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین

پس از شناسایی سویه های بیوفیل مثبت در این مطالعه، حضور ژن های *icaA*، *icaD*، *clfA*، *fnbpA* و *cna* در میان این سویه ها با استفاده از پرایمر های اختصاصی (جدول ۱) و برنامه حرارتی که پیشتر معرفی شد، تعیین گردید (۲۵).

بررسی اثر اکسید نیتریک بر تشکیل بیوفیل

جهت تعیین اثر اکسید نیتریک بر تشکیل بیوفیل توسط سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از دو غلظت بالا (۳۰ میکرومولار) و پایین (۱۲۵ نانومولار) سدیم نیتروپروساید و آزمون کمی میکروتیتر پلیت استفاده گردید. برای این منظور از هر کدام از سویه های مولد بیوفیل قوی، متوسط و ضعیف ۲ سویه (مجموعاً ۶ سویه) انتخاب گردید. سپس کشت باکتری در محیط آبگوشت تریپتیک سوی واجد ۰/۲۵ درصد سوکروز تهیه و در مرحله بعد غلظت یک میلیون

۱۰۰ × (میانگین جذب نوری چاهک های تیمار شده/میانگین جذب نوری چاهک های کنترل مثبت) = درصد تخریب بیوفيلم

جدول ۱- توالی پرایمرها و برنامه حرارتی مورد استفاده در آزمونهای PCR.

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه (جفت باز)	برنامه حرارتی
<i>nucA</i>	F: 5'-AGTTCAGCAAATGCATCACA-3' R: 5'-TAGCCAAGCCTTGACGAACT-3'	۴۰۰	94°C: 5 min, 30 cycles (94°C: 45 S, 62°C: 45 S, 72°C: 30 S), 72°C: 7 min
<i>mecA</i>	F: 5'-GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA-3' R: 5'-CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA-3'	۳۱۰	94°C: 10 min, 25 cycles (94°C: 45 S, 55°C: 45 S, 72°C: 105 S), 72°C: 8 min
<i>mecC</i>	F: 5'-TGAACGAAGCAACAGTACACC-3' R: 5'-AGATCTTTTCCGTTTTTCAGCCT-3'	۲۳۸	95°C: 5 min, 35 cycles (95°C: 45 S, 50°C: 45 S, 72°C: 1 min), 72°C: 2 min
<i>SCCmec-I</i>	F: 5'-GCTTTAAAGAGTGTCTGTTACAGG-3' R: 5'-GTCTCTCATAGTATGACGTCC-3'	۶۱۳	94°C: 5 min, 10 cycles (94°C: 45 S, 65°C: 45 S, 72°C: 90 S), 25 cycles (94°C: 45 S, 55°C: 45 S, 72°C: 90 S), 72°C: 10 min
<i>SCCmec-II</i>	F: 5'-CGTTGAAGATGATGAAGCG-3' R: 5'-CGAAATCAATGGTTAATGGACC-3'	۳۹۸	
<i>SCCmec-III</i>	F: 5'-CCATATTGTGTACGATGCG-3' R: 5'-CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG-3'	۲۸۰	
<i>SCCmec-IVa</i>	F: 5'-GCCTTATTCGAAGAAACCG-3' R: 5'-CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG-3'	۷۷۶	
<i>SCCmec-IVb</i>	F: 5'-TCTGGAATTACTTCAGCTGC-3' R: 5'-AAACAATATTGCTCTCCCTC-3'	۴۹۳	
<i>SCCmec-IVc</i>	F: 5'-ACATATTTGTATTATCGGAGAGC-3' R: 5'-TTGGTATGAGGTATTGCTGG-3'	۲۰۰	
<i>SCCmec-IVd</i>	F: 5'-CTCAAAATACGGACCCCAATACA-3' R: 5'-TGCTCCAGTAATTGCTAAAG-3'	۸۸۱	
<i>SCCmec-V</i>	F: 5'-GAACATTGTTACTTAAATGAGCG-3' R: 5'-TGAAAGTTGTACCCTTGACACC-3'	۳۲۵	
<i>icaA</i>	F: 5'-ACACTTGCTGGCGCAGTCAA-3' R: 5'-TCTGGAACCAACATCCAACA-3'	۱۸۸	95°C: 10 min, 25 cycles (94°C: 1 min, 55°C: 1 min, 72°C: 1 min), 72°C: 10 min
<i>icaD</i>	F: 5'-ATGGTCAAGCCCAGACAGAG-3' R: 5'-AGTATTTCAATGTTTAAAGCAA-3'	۱۹۸	
<i>cna</i>	F: 5'-AAAGCGTTGCCTAGTGGAGA-3' R: 5'-AGTGCCTTCCCAAACCTTTT-3'	۱۹۲	
<i>fnbpA</i>	F: 5'-CATAAATTGGGAGCAGCATCA-3' R: 5'-ATCAGCAGCTGAATTCCCATT-3'	۱۲۸	
<i>clfA</i>	F: 5'-ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT-3' R: 5'-CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG-3'	۲۹۲	
<i>pvl</i>	F: 5'-ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA-3' R: 5'-GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAAGC-3'	۴۳۳	94°C: 10 min, 10 cycles (94°C: 45 S, 55°C: 45 S, 72°C: 75 S), 25 cycles (94°C: 45 S, 50°C: 45 S, 72°C: 75 S), 72°C: 10 min

تجزیه و تحلیل داده های آماری

تمامی آنالیزهای آماری با استفاده از آزمونهای Chi-squared و One-way ANOVA و نرم افزار GraphPad Prism 8 انجام شد.

نتایج

شناسایی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به

متی سیلین

بر اساس نتایج حاصل از آزمون مولکولی جهت شناسایی ۳۱۸ ایزوله مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *nucA* در مجموع ۲۹۷ سویه (۹۳ درصد) واجد باند ۴۰۰ جفت بازی مربوط به ژن *nucA* بودند و ۲۱ سویه دیگر که در آزمایشگاه بیمارستان به اشتباه به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد شناسایی قرار گرفته بودند، از روند بررسی خارج شدند. در بررسیهای بعدی مشخص شد که این سویه ها متعلق به گونه های *استافیلوکوکوس لوگدوننسیس*^۸ و *استافیلوکوکوس شلیفری*^۹ بودند. همچنین، از ۲۹۷ سویه مورد تأیید قرار گرفته، در مجموع ۹۰ سویه (۳۰ درصد) بر روی محیط ژلوز مولر هینتون واجد اگزاسیلین رشد کردند و نسبت به دیسک سفوکسی تین نیز مقاوم بودند. همچنین، تمامی ۹۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از نظر حضور ژن *mecA* مثبت بودند و ژن *mecC* نیز در هیچکدام از این سویه ها شناسایی نشد.

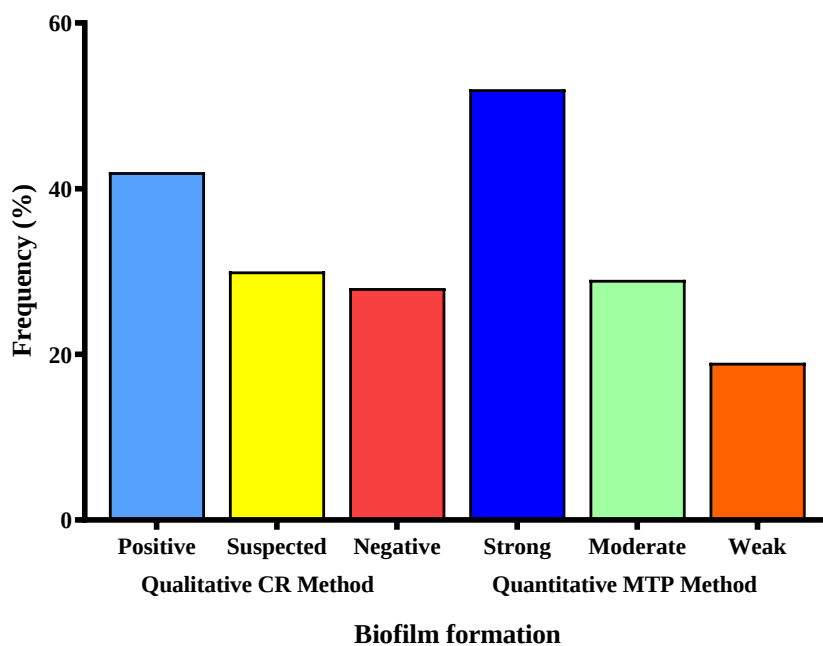
بررسی تشکیل بیوفیلم در سویه های *استافیلوکوکوس*

اورئوس مقاوم به متی سیلین

بر اساس نتایج حاصل از آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو مشخص گردید که ۳۸ سویه (۴۲ درصد) واجد کلنیهای مشکی و اسلایم مثبت بودند و ۲۷ سویه (۳۰ درصد) نیز با تشکیل کلنیهای قرمز تیره به عنوان اسلایم مشکوک تقسیم بندی شدند؛ همچنین، ۲۵ سویه (۲۸ درصد) واجد کلنیهای قرمز روشن به عنوان سویه های بیوفیلم منفی شناسایی و از مطالعه خارج شدند (شکل ۱). بنابراین در مجموع ۶۵ سویه (۷۲ درصد) جهت بررسی کمی انتخاب شدند. در آزمون کمی میکروتیتر پلیت نیز از مجموع ۶۵ سویه اسلایم مثبت و اسلایم مشکوک انتخاب شده، ۳۴ سویه (۵۲ درصد) مولد بیوفیلم قوی، ۱۹ سویه (۲۹ درصد) مولد بیوفیلم متوسط و ۱۲ سویه (۱۹ درصد) نیز قادر به تولید بیوفیلم ضعیف بودند (شکل ۱). در این میان، ۴۲ سویه (۶۵ درصد) و ۲۳ سویه (۳۵ درصد) به ترتیب از نمونه های ادراری خانمها و آقایان جداسازی شدند ($P < 0.0001$). علاوه بر این، سویه های مولد بیوفیلم قوی در میان سویه های جداسازی شده از نمونه های خانمها و سویه های بیوفیلم متوسط و ضعیف در میان سویه های جداسازی شده از نمونه های آقایان از فراوانی بالاتری برخوردار بودند، که این اختلافات معنی دار نبودند (جدول ۲).

^۸ *Staphylococcus lugdunensis*

^۹ *Staphylococcus schleiferi*



شکل ۱- درصد فراوانی تشکیل بیوفیلم در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین.

جدول ۲- فراوانی سویه های بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین جداسازی شده از بیماران بر اساس جنس.

بیوفیلم	جنس		تعداد (درصد)	P value
	آقایان (درصد)	خانمها (درصد)		
ضعیف	۵ (۲۲)	۷ (۱۷)	۱۲ (۱۹)	۰/۴۷۵۶
متوسط	۷ (۳۰)	۱۲ (۲۹)	۱۹ (۲۹)	۰/۹۹۹۹
قوی	۱۱ (۴۸)	۲۳ (۵۵)	۳۴ (۵۲)	۰/۳۹۶۰
تعداد (درصد)	۲۳ (۳۵)	۴۲ (۶۵)	۶۵	<۰/۰۰۰۱

سیپروفلوکساسین (۷۴ درصد)، اریترومايسين (۷۲ درصد)، کلیندامایسین (۶۸ درصد)، جنتامایسین (۶۶ درصد)، تتراسایکلین (۶۳ درصد) و ریفاپمین (۶۲ درصد) نیز از نظر درصد فراوانی در مرتبه بعدی قرار داشتند (شکل ۲). همچنین، تمامی سویه ها نسبت به کلرامفنیکل، لینزولاید، کینوپریستین-دالفوپریستین و ونکومايسين حساسیت نشان دادند. در این مطالعه، ۱۷ سویه (۲۶ درصد) مقاوم به متی سیلین که نسبت به تمامی آنتی بیوتیکهای مورد مطالعه به جز پنی سیلین حساس بودند، به عنوان سویه های /استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه طبقه بندی شدند. از طرف دیگر، ۴۷ سویه (۷۲ درصد) نیز حداقل نسبت به سه خانواده آنتی بیوتیکی (بتا-لاکتام، کینولونها و ماکرولیدها) مقاومت نشان دادند و به عنوان سویه های واجد مقاومت چندگانه معرفی شدند. علاوه بر این، حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد آنتی بیوتیک ونکومايسين برای تمامی ۶۵ سویه مورد مطالعه ۱-۱۲۵/۰ میکروگرم/میلی لیتر بود که مؤید حساسیت این سویه ها نسبت به ونکومايسين بود.

در مجموع از ۶۵ سویه /استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلیم، بیشترین تعداد سویه ها به ترتیب از بیماران در بازه های سنی ۶۱-۷۰ (۳۸ درصد)، ۵۱-۶۰ سال (۲۶ درصد) و ۷۱-۸۰ سال (۱۷ درصد) جداسازی گردید (جدول ۳). در آقایان بیشترین فراوانی سویه ها متعلق به بیماران در بازه های سنی ۶۱-۷۰ سال (۳۹ درصد)، ۴۱-۵۰ سال (۲۲ درصد) و ۵۱-۶۰ سال (۱۷ درصد) بود. اما در مورد خانمها، ۳۸، ۳۱ و ۱۹ درصد سویه ها به ترتیب از بیماران در بازه های سنی ۶۱-۷۰ سال، ۵۱-۶۰ سال و ۷۱-۸۰ سال جداسازی شدند.

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های /استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلیم

بر اساس نتایج حاصل از آزمون انتشار دیسک جهت تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های /استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلیم مشخص شد که تمامی ۶۵ سویه نسبت به پنی سیلین مقاوم بودند و مقاومت نسبت به

جدول ۳- فراوانی سویه های بیوفیلیم مثبت در نمونه های ادراری جداسازی شدن از نمونه های آقایان و خانمها بر اساس سن.

سن	جنس		تعداد (درصد)	P value
	آقایان (درصد)	خانمها (درصد)		
۳۱-۴۰	۲ (۹)	۱ (۲)	۳ (۵)	۰/۰۵۸۲
۴۱-۵۰	۵ (۲۲)	۴ (۱۰)	۹ (۱۴)	۰/۰۳۲۷
۵۱-۶۰	۴ (۱۷)	۱۳ (۳۱)	۱۷ (۲۶)	۰/۰۳۰۷
۶۱-۷۰	۹ (۳۹)	۱۶ (۳۸)	۲۵ (۳۸)	۰/۹۹۹۹
۷۱-۸۰	۳ (۱۳)	۸ (۱۹)	۱۱ (۱۷)	۰/۳۳۵۰
تعداد (درصد)	۲۳ (۳۵)	۴۲ (۶۵)	۶۵	<۰/۰۰۰۱

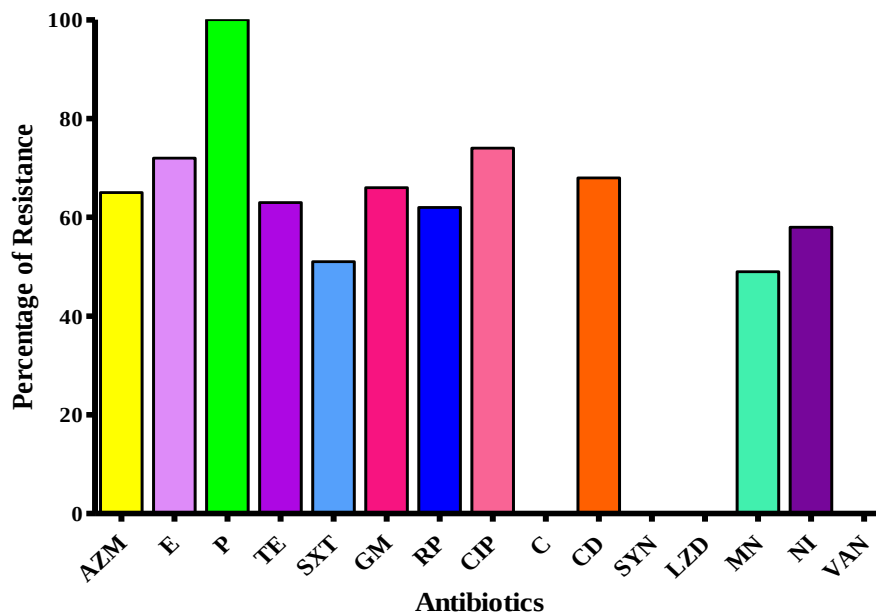
های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه شناسایی شدند. این سویه ها تنها نسبت به پنی سیلین مقاوم و نیز واجد ژن *pvl* بودند.

تعیین حضور ژنهای مرتبط با بیوفیلیم

بر اساس نتایج حاصل از آزمونهای PCR جهت شناسایی ژنهای مرتبط با بیوفیلیم مشخص شد که به ترتیب ۸۶ و ۸۹ درصد سویه ها از نظر وجود ژنهای *icaA* و *icaD* مثبت بودند (جدول ۴). همچنین، فراوانی ژنهای *clfA*، *fnbpA* و *cna* نیز به ترتیب محدود به ۷۵، ۷۲ و ۵۸ درصد سویه ها بود. از طرف دیگر، ۱۰۰ درصد سویه های مولد بیوفیلیم قوی و متوسط واجد ژنهای *icaA* و *icaD* بودند و اختلاف معناداری بین حضور تمامی ژنها در سویه های مولد بیوفیلیم قوی و متوسط در مقایسه با سویه های تولید کننده بیوفیلیم ضعیف مشاهده شد ($P < 0.0001$).

بررسی حضور SCCmec تایپهای مختلف در میان سویه های مقاوم به متی سیلین

در این مطالعه تمامی ۶۵ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلیم واجد ژن *mecA* بودند و نتایج حاصل از آزمون multiplex-PCR جهت تعیین حضور انواع SCCmec تایپهای مختلف در میان سویه ها نشان داد که هر ۵ تایپ مورد بررسی (I-V) در میان سویه ها، وجود داشتند. بر این اساس، ۳۲ سویه (۴۹ درصد)، ۱۱ سویه (۱۷ درصد) و ۵ سویه (۸ درصد) به ترتیب واجد SCCmec تایپهای III، I و II بودند و تمامی این ۴۸ سویه (۷۴ درصد) به عنوان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین اکتسابی از بیمارستان طبقه بندی شدند. این سویه ها مقاومت چندگانه داشتند و فاقد ژن *pvl* بودند. همچنین، ۸ سویه (۱۲ درصد)، ۳ سویه (۵ درصد) و ۶ سویه (۹ درصد) نیز که به ترتیب برای SCCmec تایپهای IVc، IVa و V مثبت بودند به عنوان سویه



شکل ۲- درصد فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلیم.

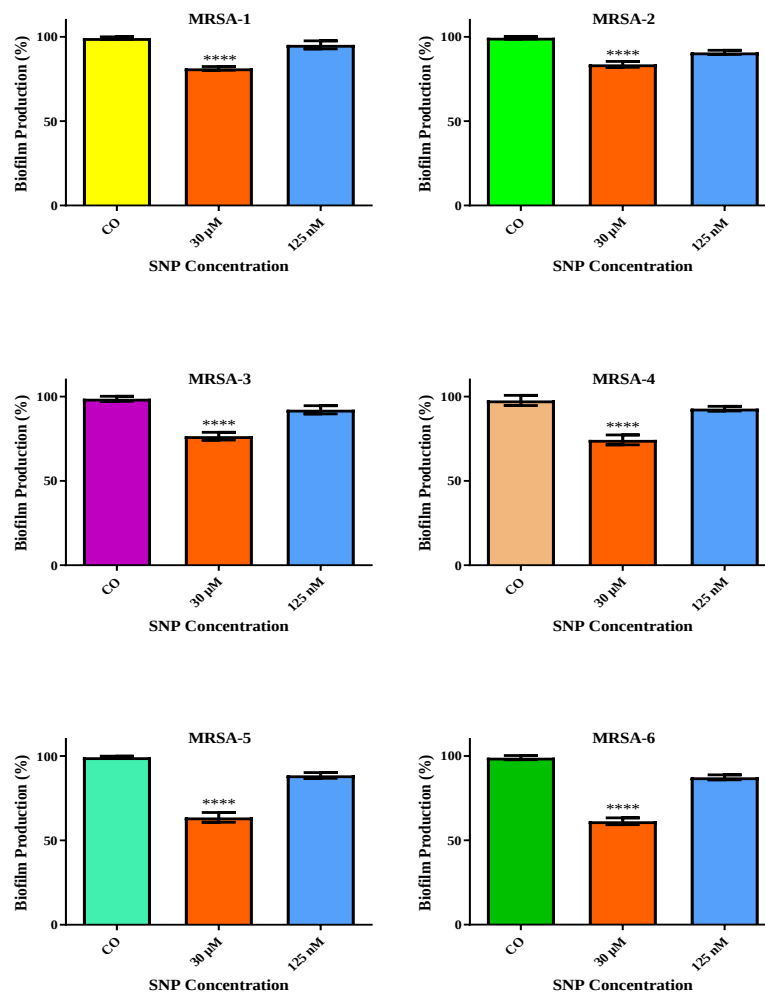
جدول ۴- فراوانی ژنهای مرتبط با تشکیل بیوفیلم در میان سویه های مولد بیوفیلم قوی/متوسط و ضعیف.

ژن	سویه های مولد بیوفیلم قوی / متوسط (درصد)	سویه های مولد بیوفیلم ضعیف (درصد)	تعداد کلی	P value
<i>icaA</i>	۵۳ (۱۰۰)	۳ (۲۷)	۵۶ (۸۶)	<۰/۰۰۰۱
<i>icaD</i>	۵۳ (۱۰۰)	۵ (۴۵)	۵۸ (۸۹)	<۰/۰۰۰۱
<i>clfA</i>	۴۳ (۸۱)	۶ (۵۴)	۴۹ (۷۵)	<۰/۰۰۰۱
<i>cna</i>	۳۵ (۶۶)	۳ (۲۷)	۳۸ (۵۸)	<۰/۰۰۰۱
<i>fnbpA</i>	۴۳ (۸۱)	۴ (۳۶)	۴۷ (۷۲)	<۰/۰۰۰۱
تعداد (درصد)	۵۳ (۸۱)	۱۱ (۱۹)	۶۵	<۰/۰۰۰۱

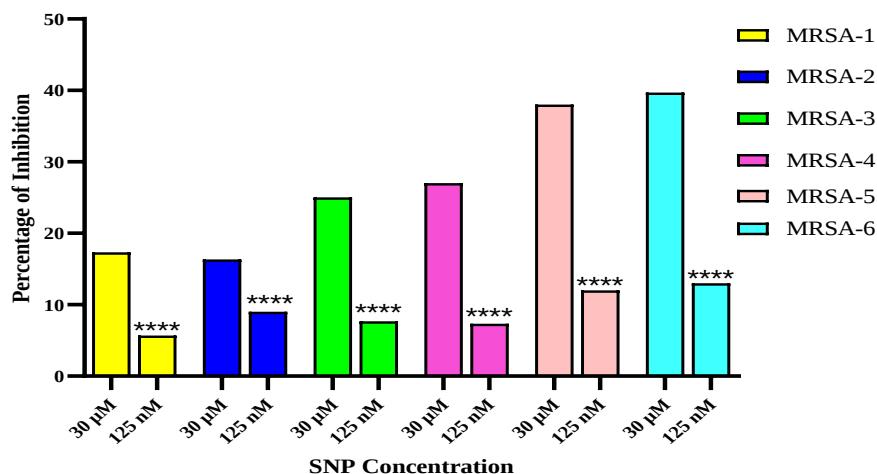
بررسی اثر اکسید نیتریک بر تشکیل بیوفیلم

در مطالعه حاضر در مجموع ۶ سویه /ستافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم قوی (۲ سویه)، متوسط (۲ سویه) و ضعیف (۲ سویه) انتخاب شدند و اثر دو غلظت مختلف اکسید نیتریک بر تشکیل بیوفیلم توسط این سویه ها مورد ارزیابی قرار گرفت. بر این اساس مشخص شد که در تمامی سویه ها غلظت ۳۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید به طور معناداری باعث کاهش تشکیل بیوفیلم شد ($P < 0.0001$)

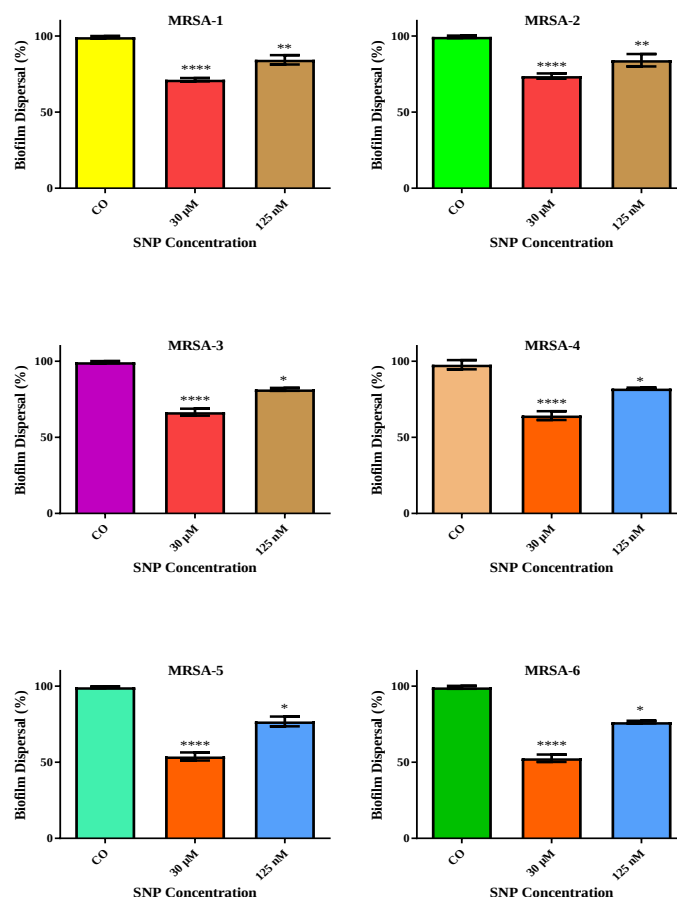
(شکل ۳). اما در مقابل، در غلظت ۱۲۵ نانومولار سدیم نیتروپروساید کاهش میزان تشکیل بیوفیلم چندان قابل توجه نبود. بدین ترتیب، در حضور غلظت ۳۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید میزان تشکیل بیوفیلم در سویه های مولد بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف، به ترتیب ۲۰-۱۴ درصد، ۳۰-۲۲ درصد و ۴۲-۳۳ درصد، کاهش پیدا کرد (شکل ۴). همچنین، میزان کاهش تشکیل بیوفیلم در مقابل غلظت ۱۲۵ نانومولار سدیم نیتروپروساید در سویه های مولد بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف به ترتیب ۱۱-۲، ۱۱-۵ و ۱۵-۱۰ درصد بود.



شکل ۳- بررسی اثر غلظت های مختلف سدیم نیتروپروساید بر تشکیل بیوفیلم در سویه های مولد بیوفیلم قوی (۱ و ۲)، متوسط (۳) و ضعیف (۴ و ۵ و ۶).



شکل ۴- درصد مهار تشکیل بیوفیلم در سویه های مولد بیوفیلم قوی (۱ و ۲)، متوسط (۳ و ۴) و ضعیف (۵ و ۶) در حضور غلظت ۳۰ میکرومولار و ۱۲۵ نانومولار سدیم نیتروپروساید.

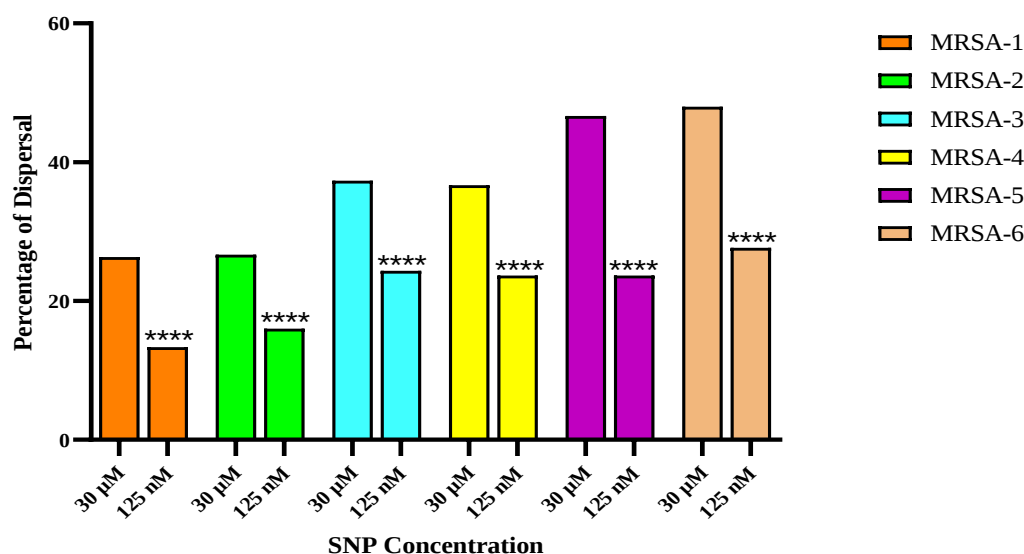


شکل ۵- بررسی اثر غلظتهای مختلف سدیم نیتروپروساید بر تخریب بیوفیلم در سویه های مولد بیوفیلم قوی (۱ و ۲)، متوسط (۳ و ۴) و ضعیف (۵ و ۶).

بررسی اثر اکسید نیتریک بر تخریب بیوفیلم

به دنبال بررسی اثر دو غلظت مختلف سدیم نیتروپروساید بر تخریب بیوفیلم تشکیل شده توسط سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مشخص شد که غلظت ۳۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید قادر به تخریب قابل ملاحظه بیوفیلم تشکیل شده است (شکل ۵). همچنین، غلظت ۱۲۵ نانومولار این ترکیب نیز باعث تخریب بیوفیلم شد که این اثربخشی بیشتر از تأثیر مهاری آن بر تشکیل بیوفیلم بود. به طور کلی غلظت ۳۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید به ترتیب به میزان

۲۴-۳۰، ۳۹-۲۲ و ۵۰-۴۴ درصد در سویه های مولد بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف قادر به مهار تشکیل بیوفیلم بود. همچنین، میزان تخریب بیوفیلم تشکیل شده در مقابل غلظت ۱۲۵ نانومولار سدیم نیتروپروساید در سویه های تولیدکننده بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف نیز به ترتیب ۲۰-۱۱، ۲۸-۲۰ و ۳۰-۲۱ درصد تعیین گردید (شکل ۶). به طور کلی اثر تخریبی غلظت بالای سدیم نیتروپروساید بر بیوفیلم ناشی از سویه های مولد بیوفیلم ضعیف بالاتر از سویه های مولد بیوفیلم متوسط و قوی بود.



شکل ۶- درصد تخریب بیوفیلم تشکیل شده توسط سویه های مولد بیوفیلم قوی (۱ و ۲)، متوسط (۳ و ۴) و ضعیف (۵ و ۶) در حضور غلظت ۳۰ میکرومولار و ۱۲۵ نانومولار سدیم نیتروپروساید.

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم به دلیل مقاومت بالا در برابر طیف وسیعی از آنتی بیوتیکها و عوامل محیطی و همچنین محافظت از کنسرسيوم تشکیل شده در برابر واکنشهای ایمنی میزبان، نقش بسیار مهمی در پاتوژنز عفونتهای ادراری ایفا می کند (۲۷). بنابراین، مطالعه ویژگیهای سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مولد بیوفیلم به پیشگیری، مدیریت و درمان عفونتهای ادراری ناشی از این باکتریها کمک می کند. در مطالعه حاضر جهت شناسایی ایزوله های جمع آوری شده از آزمایشگاه بیمارستان مورد نظر از آزمون PCR و پرایمرهای اختصاصی استفاده شد و بر این اساس مشخص گردید که ۷ درصد سویه های جمع آوری شده به اشتباه به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد شناسایی قرار گرفته اند و متعلق به دو گونه استافیلوکوکوس لوگدونسیس و استافیلوکوکوس شلیفری بودند. دلیل اصلی این عدم تطابق انجام آزمون کواگولاز به روش سریع اسلاید در آزمایشگاه ها است که در آن به جای شناسایی کواگولاز

آزاد، کواگولاز متصل به دیواره سلولی که عامل لخته نیز نامیده می شود، مورد شناسایی قرار می گیرد. در واقع کواگولاز متصل به دیواره سلولی خود جزئی از اجزای سطحی میکروبی شناسایی مولکولهای ماتریکس چسبنده بوده که با اتصال به فیبرینوزن و فیبرین، باعث ایجاد پاسخ مثبت کاذب می گردد. با توجه به اینکه گونه های شلیفری و لوگدونسیس واجد کواگولاز متصل به دیواره سلولی هستند، ممکن است در آزمون کواگولاز به روش اسلاید به اشتباه به عنوان گونه اورئوس مورد شناسایی قرار گیرند (۲۸). این اشتباه پیشتر در سایر مقالات نیز گزارش شده است (۲۰، ۲۹-۳۱). بنابراین، جهت جلوگیری از شناسایی اشتباه ایزوله های باکتریایی که می تواند منجر به انتخاب غلط استراتژیهای درمانی و در نتیجه عود عفونت و ایجاد مشکلات فراوان برای بیماران می شود، استفاده از روشهای مولکولی اختصاصی، حساس و سریع مانند PCR به عنوان جایگزینی مناسب برای روشهای فنوتایپی زمایر و با دقت پایین معمول، توصیه می گردد.

در این مطالعه، ۳۰ درصد سویه ها نسبت به متی سیلین مقاوم بودند، که به طور چشمگیری کمتر از سایر مطالعات انجام گرفته در ایران و سایر کشورها (۲۷، ۳۴-۳۲) و تا حدودی منطبق بر

مطالعه انجام گرفته در ایرلند (۲۷ درصد) (۳۵) می باشد. به طور کلی تفاوت در فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین می تواند ناشی از تفاوت در شرایط بالینی بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی (سرپایی یا بستری بودن بیماران)، سطح بهداشتی بیمارستانها، شرایط فرهنگی و اقتصادی حاکم بر جامعه مورد بررسی و نهایتاً شرایط جغرافیایی محل مورد مطالعه باشد. از طرف دیگر، برای بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم از ترکیبی از روشهای کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت استفاده شد و در مجموع ۷۲ درصد سویه های مقاوم به متی سیلین در هر دو روش قادر به تشکیل بیوفیلم بودند. بر این اساس، از مجموع ۶۵ سویه اسلایم مثبت و اسلایم مشکوک، در نهایت ۵۲، ۲۹ و ۱۹ درصد سویه ها به ترتیب مولد بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف بودند. تاکنون گزارشات و آمارهای متفاوتی (۷۷-۴۱ درصد) از فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم در مطالعات مختلف ارائه شده است (۲۰، ۲۵، ۲۷، ۳۶، ۳۷). همچنین، نتایج حاصل از آزمون تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم نشان داد که آنتی بیوتیکهای ونکومايسين، لینزولاید، کینوپریستین و دالفوپریستین مؤثرترین آنتی بیوتیکها جهت درمان عفونتهای ناشی از این باکتریها بودند. در مورد بسیاری از آنتی بیوتیکها مانند اریترومايسين، سیپروفلوکساسین، کلیندامایسین و تتراسایکلین مقاومت بسیار بالاتری (۸۵-۹۴ درصد) در مطالعات پیشین ارائه شده است و از طرفی مقاومت نسبت به جنتامایسین به طور معناداری بیشتر از سایر گزارشات می باشد (۵، ۲۲، ۴۰-۳۸). این تفاوت در آمار ارائه شده در مطالعه حاضر در مقایسه با سایر مقالات می تواند ناشی از این امر باشد که در این مطالعه ۲۶ درصد سویه های مورد بررسی، سویه های اکتسابی از جامعه بودند که تنها نسبت به پنی سیلین مقاوم بودند و مقاومتی نسبت به سایر آنتی بیوتیکها نشان ندادند. فراوانی این سویه ها که واجد *SCCmec* تایپهای IV و V بوده و ژن *pvl* نیز در تمامی این سویه ها مورد شناسایی قرار گرفت، از تمامی مطالعات پیشین انجام گرفته بر روی نمونه های بالینی، محیطی، دامی و غذایی بالاتر است (۴، ۱۸، ۴۱، ۴۲) و به همین دلیل مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای مذکور به طور چشمگیری

کاهش پیدا کرد، اما در میان سویه های اکتسابی از بیمارستان (سویه های واجد *SCCmec* تایپهای I-III) آمار مقاومتی نسبت به آنتی بیوتیکهای مذکور بسیار بالا بود (۸۳-۱۰۰ درصد) و ۹۸ درصد نیز واجد مقاومت چندگانه بودند. از سوی دیگر، افزایش چشمگیر مقاومت نسبت به جنتامایسین می تواند ناشی از مصرف بالای این آنتی بیوتیک در درمان عفونتهای ادراری در شهر تهران باشد. بر اساس یافته های این مطالعه می تواند ادعا داشت که تقریباً بیشتر آنتی بیوتیکهایی که به طور رایج جهت درمان بیماران مبتلا به عفونت ادراری استفاده می شوند، فاقد اثربخشی لازم بوده و لذا از تجویز تجربی آنها برای درمان چنین عفونتهایی بدون انجام آزمونهای تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی در آزمایشگاه ها باید اجتناب شود. از آنجایی که سویه های اکتسابی از بیمارستان معمولاً سوپر آنتی ژن هایی شامل انتروتوکسین ها، *agrofolyatino toksin* ها و *toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1) را که اغلب با بیماری های جدی نظیر پنومونی نکرروزان، سندروم شوک توکسیک و پورپورا فولمینانس مرتبط هستند، را تولید نمی کنند، شناسایی منشا سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* نقش بسزایی در را پیش بینی سیر بیماری و اتخاذ رویکرد درمانی مناسب توسط پزشکان دارد (۴۳). در سالهای اخیر جهت مبارزه با افزایش رو به رشد مقاومت آنتی بیوتیکی، یافتن عوامل ضد میکروبی با اثرات جانبی پایینتر و اثرات ضد باکتریایی قوی و مناسب از قبیل نانوذرات، عصاره های گیاهی، باکتریوفاژها و همچنین گاز درمانی، توجه زیادی را به خود جلب کرده است (۴۷-۴۴). روش گاز درمانی شامل استفاده از حجم بالایی از مولکولهای گازی مانند هیدروژن، سولفید هیدروژن، مونواکسید کربن، دی اکسید کربن، دی اکسید گوگرد و اکسید نیتریک است (۴۸). اکسید نیتریک یک مولکول گاز درون زای^{۲۱} بسیار مهم در فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی می باشد. اکسید نیتریک واجد فعالیت ضد باکتریایی قوی در برابر تهاجم باکتری بدون ایجاد مقاومت دارویی در پستانداران است و خاصیت ضد باکتریایی آن به اثر مخرب اکسید نیتریک بر پروتئینها و مولکولهای DNA در غلظتهای بالا نسبت داده می شود (۴۹).

نیتریک مورد بررسی قرار گیرد. همچنین اکسید نیتریک می تواند به عنوان یک درمان مکمل به بازیابی حساسیت میکروبی نسبت به آنتی بیوتیک های متداول کمک نماید. به این منظور پژوهش های بیشتری برای تعیین اثر سینرژیسمی میان آنتی بیوتیک های گوناگون و اکسید نیتریک جهت دستیابی به بهترین ترکیب با اثر بخشی بالا و در عین حال دوز درمانی ایمن، مورد نیاز است.

در این تحقیق جهت بررسی سازوکار مولکولی تشکیل بیوفیلم در میان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم، ۵ ژن مهم درگیر در فرآیند تشکیل بیوفیلم انتخاب شدند و فراوانی این ژنها در میان سویه ها تعیین گردید. بر این اساس مشخص شد که دو ژن *icaD* و *icaA* در ۸۹ و ۸۶ درصد سویه ها حاضر بودند و فراوانی آنها در سویه های مولد بیوفیلم قوی و متوسط ۱۰۰ درصد بود. در مطالعات مختلف نیز توانایی تشکیل بیوفیلم در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* را کاملاً مرتبط با حضور اپرون *icaABCD* دانسته اند (۲۵، ۵۳) و این ژنها را به عنوان تنها عوامل مهم و ضروری برای چسبندگی بین سلولی و تولید بیوفیلم چندلایه باکتریایی مطرح کرده اند (۵۴، ۵۵). اما در مقابل، سویه های فاقد ژنهای مربوط به اپرون *icaABCD* نیز قادر به تشکیل بیوفیلم بودند، که همین امر مؤید نقش مهم سایر ژنها از قبیل *cna*، *clfA* و *fnbpA* در تشکیل بیوفیلم و از طریق مسیری مستقل از اپرون *ica* است (۵). (۲۵). بنابراین بر اساس نتایج این پژوهش می توان اینگونه نتیجه گیری کرد که غلظت بالای سدیم نیتروپروساید که تأثیر بالاتری بر سویه های مولد بیوفیلم ضعیف (فاقد ژنهای *icaA* و *icaD*) و اثر کمتری بر سویه های واجد ژنهای *icaA* و *icaD* (بیوفیلم قوی و متوسط) داشت، احتمالاً تأثیر ضد بیوفیلمی خود را بیشتر بر سایر ژنها اعمال می کند و از تأثیر کمتری بر ژنهای *icaA* و *icaD* برخوردار می باشد. به همین دلیل میزان چسبندگی در سویه های بیوفیلم ضعیف از کاهش معناداری برخوردار بود. البته نتیجه گیری دقیق در این مورد نیازمند بررسی بیان ژنهای مختلف درگیر در فرآیند تشکیل بیوفیلم در حضور سدیم نیتروپروساید است.

Ren و همکاران جهت ممانعت از تشکیل بیوفیلم باکتریهای *اشرشیا کلای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* از سوندهای الکتروشیمیایی آزادکننده اکسید نیتریک واجد مخزنی حاوی محلول نمک غیرآلی نیتريت به همراه الکتروود مسی، استفاده کردند. در آن مطالعه سوندها با آزادسازی مداوم اکسید نیتریک در مدت دو روز باعث کاهش قابل توجه تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلای* شد (۵۰). مدارک زیادی بر این فرضیه که "پراکندگی وابسته به اکسید نیتریک در بیوفیلم گونه های مختلف ممکن است حفاظت شده باشد"، مهر تأیید می زنند (۱۵). به عنوان مثال، در مطالعه Schlag و همکاران، بیوفیلم *استافیلوکوکوس* با اضافه کردن نیتريت طی فرآیندی که شامل آزادسازی اکسید نیتریک بود، مهار گردید (۵۱).

در مطالعه حاضر، جهت بررسی اثر اکسید نیتریک بر تشکیل و تخریب و پراکندگی بیوفیلم سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از دو غلظت ۳۰ میکرومولار و ۱۲۵ نانومولار سدیم نیتروپروساید به عنوان آزاد کننده اکسید نیتریک استفاده گردید. بر این اساس مشخص شد که سدیم نیتروپروساید در غلظت بالا به شکل محسوسی قادر به کاهش میزان تولید بیوفیلم و همچنین افزایش میزان تخریب بیوفیلم تشکیل شده بود. غلظت پایین سدیم نیتروپروساید نیز توانست میزان بیوفیلم تشکیل شده را کاهش دهد اما این کاهش چندان محسوس نبود و عملاً اثر قابل توجهی بر ممانعت از تشکیل بیوفیلم نداشت. در مقابل، تا حدودی توانست باعث پراکندگی و تخریب بیوفیلم شود اما در مقایسه با غلظت بالای این ترکیب فعالیت بسیار ضعیفتری از خود نشان داد. بر اساس نتایج به دست آمده می توان اعلام کرد که غلظت ۳۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید بیشترین تأثیر را بر تشکیل و تخریب بیوفیلم سویه های مولد بیوفیلم ضعیف و کمترین اثر را بر سویه های مولد بیوفیلم قوی داشت. بنابراین، به نظر می رسد هرچه میزان چسبندگی سویه ها کمتر باشد اثربخشی اکسید نیتریک نیز بیشتر خواهد بود. البته شایان ذکر است که عوامل محیطی نظیر اشعه ماورا بنفش، دمای بالا، یون های فلزی، اسیدها یا آنزیم ها می توانند بر میزان آزادسازی اکسید نیتریک موثر است (۵۲). لذا توصیه می شود در مطالعات بعدی نقش هر یک از آن ها بر خاصیت آنتی باکتریال اکسید

نتیجه گیری

نکته بسیار قابل توجه در این مطالعه افزایش فراوانی سویه های /ستافیلوکوکوس/ اورئوس مقاوم به متی سیلین اکتسابی از جامعه در شهر تهران است. این سویه ها که از جامعه وارد بیمارستان شده اند احتمالاً متعلق به کلون تایپهای مشخصی هستند که در بیمارستان و بیماران بستری در آن در حال گردش می باشند و از توانایی بالایی جهت کسب ژنهای مقاومت و عوامل حدت مختلف برخوردار هستند. این سویه ها در آینده می توانند به یک معضل بهداشتی مهم در این بیمارستان مبدل شده و مجدداً با مقاومت و حدت بالاتر از بیمارستان وارد جامعه وارد شوند. از سوی دیگر، غلظت ۳۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید در شرایط برون تنی^{۲۲} به طور چشمگیری بر تشکیل بیوفیلم و تخریب بیوفیلم تشکیل شده ناشی از /ستافیلوکوکوس/ اورئوس مقاوم به متی سیلین مؤثر بود که می تواند به عنوان راهکاری جهت جلوگیری از انتشار این سویه ها در سیستم های بهداشتی و درمانی مورد توجه قرار گیرد. این مطالعه در مجموع یک رویکرد درمانی نوآورانه را ارائه می کند که می تواند به یک عامل ضد باکتری بالینی مستقل و یا مکملی برای آنتی بیوتیک های موجود برای مقابله با تهدید رو به رشد /ستافیلوکوکوس/ اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم و سایر پاتوژن های دارای اولویت حیاتی توسعه یابد. البته جهت تایید بیشتر این امر تحقیقات آتی باید اثربخشی عامل ضد باکتریایی پیشنهادی در مطالعه حاضر را در مدل های عفونت حیوانی ارزیابی کند.

تأییدیه اخلاقی

این مقاله با کد IR.UI.REC.1403.110 مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه اصفهان قرار گرفته است.

منابع مالی

نویسندگان مقاله هیچگونه کمک مالی و گرنت پژوهشی جهت انجام این تحقیق دریافت نکرده اند.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان این مقاله وجود ندارد.

REFERENCE

۱. McLellan LK, Hunstad DA. Urinary tract infection: pathogenesis and outlook. Trends in Molecular Medicine. 2016;22(11):946-57.
۲. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Marra M, Zummo S, Biondo C. Urinary tract infections: the current scenario and future prospects. Pathogens. 2023;12(4):623.
۳. Storme O, Tirán Saucedo J, Garcia-Mora A, Dehesa-Dávila M, Naber KG. Risk factors and predisposing conditions for urinary tract infection. Therapeutic Advances in Urology. 2019;11:1756287218814382.
۴. Rahimi F. Biofilm production among *Staphylococcus aureus* strains isolated from healthy people. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine 2015;20(68):21-9.
۵. Rahimi F, Katouli M, Karimi S. Biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from catheterized patients with urinary tract infection. Microbial Pathogenesis. 2016;98:69-76.
۶. Ghasemian A, Najar Peerayeh S, Bakhshi B, Mirzaee M. The microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) genes among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from hospitalized children. Iranian Journal of Pathology. 2015;10(4):258-64.
۷. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Nature Reviews Microbiology. 2014;12(1):49-62.
۸. van der Schoor AS, Voor in't holt AF, Zandijk WH, Bruno MJ, Gommers D, van den Akker JP, et al. Dynamics of *Staphylococcus aureus* in patients and the hospital environment in a tertiary care hospital in the Netherlands. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2023;12(1):148.
۹. Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2014;78(3):510-43.
۱۰. Dincer S, Uslu FM, Delik A. Antibiotic resistance in biofilm. Bacterial biofilms: IntechOpen; 2020.
۱۱. Berger I, Loewy ZG. Antimicrobial resistance and novel alternative approaches to conventional antibiotics. Bacteria. 2024;3(3):171-82.
۱۲. Ma T, Zhang Z, Chen Y, Su H, Deng X, Liu X, et al. Delivery of nitric oxide in the cardiovascular system: implications for clinical diagnosis and therapy. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(22):12166.
۱۳. Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. Nature Reviews Microbiology. 2004;2(10):820-32.
۱۴. Cho KJ, Koh JS, Choi JB, Park SH, Lee WS, Kim JC. Correlation between nitric oxide and urodynamics in men with bladder outlet obstruction. International Neurourology Journal. 2022;26(Suppl 1):S15.
۱۵. Poh WH, Rice SA. Recent developments in nitric oxide donors and delivery for antimicrobial and anti-biofilm applications. Molecules. 2022;27(3):674.
۱۶. Mihi MR, Cabral V, Pattabhi R, Tar MT, Davies KP, Friedman AJ, et al. Sustained nitric oxide-releasing nanoparticles interfere with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm formation in a rat central venous catheter model. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2017;61(1):10.1128/aac. 02020-16.
۱۷. Howlin RP, Cathie K, Hall-Stoodley L, Cornelius V, Duignan C, Allan RN, et al. Low-dose nitric oxide as targeted anti-biofilm adjunctive therapy to treat chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Molecular Therapy. 2017;25(9):2104-16.

۱۸. Rahimi F, Karimi S. Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from poultry in Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2015;10(4):e30885.
۱۹. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 32th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2022.
۲۰. Rahimi F, Qasemi A. Frequency of biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infection in Tehran during 2020-2022. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2023;28(100):43-56.
۲۱. Rahimi F, Bouzari M, Maleki Z, Rahimi F. Antibiotic susceptibility pattern among *Staphylococcus* spp. with emphasis on detection of *mecA* gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2009;4(3): 143-50.
۲۲. Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characteristics of hospital-and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. Journal of Medical Microbiology. 2014;63(6):796-804.
۲۳. Rahimi F, Shokoohizadeh L. Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains among inpatients and outpatients in a referral hospital in Tehran, Iran. Microbial Pathogenesis. 2016;97:89-93.
۲۴. McClure J-A, Conly JM, Lau V, Elsayed S, Louie T, Hutchins W, et al. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from-resistant staphylococci. Journal of Clinical Microbiology. 2006;44(3):1141-4.
۲۵. Mostafavi NS, Rahimi F, Khashei S. Characterization of clonal groups of antibiotic-resistant biofilm-forming *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infections in Isfahan, Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2024;19(4):e143383.
۲۶. GA OT. Microtiter dish biofilm formation assay. Journal of Visualized Experiments. 2011;30(47):e2437.
۲۷. Aniba R, Dihmane A, Raqraq H, Ressmi A, Nayme K, Timinouni M, et al. Characterization of biofilm formation in uropathogenic *Staphylococcus aureus* and their association with antibiotic resistance. The Microbe. 2024;2:100029.
۲۸. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 7th Edition ed: Jones & Bartlett Learning; 2020.
۲۹. Rahimi F, Mehmandoost J, Danesh M. Misidentification of common pathogenic bacteria in a university hospital laboratory. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2016;21(72):49-54.
۳۰. Rahimi F. Frequency of methicillin resistant *S. aureus* strains isolated from patients with diabetic foot infection in Isfahan during 2021. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2022;27(99):1-12.
۳۱. Rahimi F, Khashei S. Typing and antibiotic resistance pattern of biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains with multiple drug resistance isolated from patients with urinary infection in Tehran during 2021 and 2022. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2024;In Press.
۳۲. Mitiku A, Aklilu A, Biresaw G, Gize A. Prevalence and associated factors of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) among urinary tract infection suspected patients attending at Arba Minch General Hospital, Southern Ethiopia. Infection and Drug Resistance. 2021:2133-42.
۳۳. Yousefi M, Pourmand MR, Fallah F, Hashemi A, Mashhadi R, Nazari-Alam A. Characterization of *Staphylococcus aureus* biofilm formation in urinary tract infection. Iranian Journal of Public Health. 2016;45(4):485.

۳۴. Rahimi F, Mohaghegh F, Mostafavi NS. Clonal dissemination of biofilm producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infection in Tehran, Karaj and Isfahan during 2018. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2020;25(89):16-25.
۳۵. Looney AT, Redmond EJ, Davey NM, Daly PJ, Troy C, Carey BF, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a uropathogen in an Irish setting. *Medicine*. 2017;96(14):e4635.
۳۶. Rahimi F. Isolation of biofilm producing methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* strains from patients with urinary tract infection in Isfahan. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2018;23(82):37-44.
۳۷. Karimi A, Rahimi F. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infection in a hospital in Isfahan during 2016 *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2019;24(86):26-35.
۳۸. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie M. Prophage typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a tertiary care hospital in Tehran, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2013;6(1):80-5.
۳۹. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Prophage and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Iran. *Archives of Virology*. 2012;157(9):1807-11.
۴۰. Rahimi F, Khashei S, Katouli M. Prevalence, diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among patients with diabetic foot infections in a referral hospital in Tehran, Iran. *Archives of Clinical Infectious Diseases*. 2024;19(3):e142081.
۴۱. Rahimi F, Qasemi A. Epidemiological link between methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from 2 different cities in Iran. *Infectious Diseases in Clinical Practice*. 2019;27(3):163-9.
۴۲. Rahimi F, Danesh M, Mehmandoost J, Shokri D. Prophage typing and SCCmec typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients in Isfahan. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2016;20(71):49-58.
۴۳. Schlievert PM, Strandberg KL, Lin Y-C, Peterson ML, Leung DY. Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(1):39-49.
۴۴. Yuan Z, Lin C, Dai L, He Y, Hu J, Xu K, et al. Near-infrared light-activatable dual-action nanoparticle combats the established biofilms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its accompanying inflammation. *Small*. 2021;17(13):2007522.
۴۵. Ding X, Tang Q, Xu Z, Xu Y, Zhang H, Zheng D, et al. Challenges and innovations in treating chronic and acute wound infections: from basic science to clinical practice. *Burns and Trauma*. 2022;10:tkac014.
۴۶. Wang B, Wei P-W, Wan S, Yao Y, Song C-R, Song P-P, et al. Ginkgo biloba exocarp extracts inhibit *S. aureus* and MRSA by disrupting biofilms and affecting gene expression. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021;271:113895.
۴۷. Kunz Coyne AJ, Stamper K, Bleick C, Kebriaei R, Lehman SM, Rybak MJ. Synergistic bactericidal effects of phage-enhanced antibiotic therapy against MRSA biofilms. *Microbiology Spectrum*. 2024;12(4):e03212-23.
۴۸. Yu Y-L, Wu J-J, Lin C-C, Qin X, Tay FR, Miao L, et al. Elimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms on titanium implants via photothermally-triggered nitric oxide and immunotherapy for enhanced osseointegration. *Military Medical Research*. 2023;10(1):21.
۴۹. Hossain S, Nisbett L-M, Boon EM. Discovery of two bacterial nitric oxide-responsive proteins and their roles in bacterial biofilm regulation. *Accounts of Chemical Research*. 2017;50(7):1633-9.
۵۰. Ren H, Colletta A, Koley D, Wu J, Xi C, Major TC, et al. Thromboresistant/anti-biofilm catheters via electrochemically modulated nitric oxide release. *Bioelectrochemistry*. 2015;104:10-6.
۵۱. Schlag S, Nerz C, Birkenstock TA, Altenberend F, Götz F. Inhibition of staphylococcal biofilm formation by nitrite. *Journal of Bacteriology*. 2007;189(21):7911-9.

۵۲. Rong F, Tang Y, Wang T, Feng T, Song J, Li P, et al. Nitric oxide-releasing polymeric materials for antimicrobial applications: a review. *Antioxidants*. 2019;8(11):556.
۵۳. Goudarzi M, Mohammadi A, Amirpour A, Fazeli M, Nasiri MJ, Hashemi A, et al. Genetic diversity and biofilm formation analysis of *Staphylococcus aureus* causing urinary tract infections in Tehran, Iran. *Journal of Infection in Developing Countries*. 2019;13(09):777-85.
۵۴. Azmi K, Qrei W, Abdeen Z. Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm production in methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus* isolated from Palestinian patients. *BMC Genomics*. 2019;20:1-12.
۵۵. Chen Q, Xie S, Lou X, Cheng S, Liu X, Zheng W, et al. Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different food sources. *Microbiologyopen*. 2020;9(1):e00946.