

بررسی فعالیت ضدبیوفیلمی کاتلیسیدین LL-37 بر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری

ساناز خاشعی^۱، فاتح رحیمی^۲

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: پپتید LL-37 به‌عنوان یک کاتلیسیدین انسانی در دستگاه ادراری ترشح می‌شود و با فعالیت ضدبیوفیلمی خود نقش مهمی در حذف عفونت‌های ادراری ایفا می‌کند. هدف این مطالعه، ارزیابی فعالیت ضدبیوفیلمی کاتلیسیدین LL-37 بر ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) مولد بیوفیلیم بود.

روش‌ها: طی سال‌های ۱۴۰۲ تا ۱۴۰۳، تعداد ۱۷۳ ایزوله غیرتکراری از نمونه‌های ادراری بیماران از آزمایشگاه پاتوبیولوژی در تهران جمع‌آوری و سویه‌های MRSA با روش‌های فنوتیپی و PCR ژن‌های *mecA*، *nucA* و *mecC* شناسایی شدند. تشکیل بیوفیلیم با ژلوز قرمز کنگو و میکروتیتر پلیت بررسی شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار دیسک طبق دستورالعمل CLSI تعیین و MIC و نکوماکسین با روش broth microdilution سنجیده شد. ژن‌های مرتبط با بیوفیلیم، تایپ‌های SCCmec و *ccr* و الگوهای پروفازی با multiplex-PCR شناسایی گردیدند. MIC کاتلیسیدین LL-37 با روش broth microdilution تعیین و اثر غلظت‌های sub-MIC بر مهار و تخریب بیوفیلیم بررسی شد.

یافته‌ها: از مجموع ۱۷۳ ایزوله MRSA، ۶۱ سویه (۳۵ درصد) مولد بیوفیلیم بودند. ژن‌های *icaA* و *icaD* در بیش از ۸۰ درصد ایزوله‌ها شناسایی شد. پروفاز SGF و زیرگروه‌های آن در همه سویه‌ها حضور داشتند. ۷۹ درصد سویه‌ها واجد SCCmec تایپ‌های I-III و اکتسابی از بیمارستان بودند و ۷۲ درصد سویه‌ها دارای مقاومت چنددارویی بودند. مقادیر MIC برای LL-37 بسته به شدت بیوفیلیم بین ۳۲ تا ۵۱۲ میکروگرم/میلی‌لیتر متغیر بود. غلظت‌های sub-MIC به طور معناداری موجب کاهش تشکیل بیوفیلیم (۴۶-۵۶ درصد) و تخریب بیوفیلیم‌های تشکیل شده (۶۷-۴۸ درصد) شدند.

نتیجه‌گیری: LL-37 فعالیت ضدبیوفیلیمی قوی در برابر سویه‌های MRSA نشان داد و می‌تواند یک گزینه‌ی درمانی نویدبخش مکمل یا جایگزین در عفونت‌های ادراری مرتبط با بیوفیلیم باشد.

واژگان کلیدی: پپتید LL-37؛ *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین؛ بیوفیلیم؛ عفونت مجاری ادراری؛ تایپینگ مولکولی

ارجاع: خاشعی ساناز، رحیمی فاتح. بررسی فعالیت ضدبیوفیلمی کاتلیسیدین LL-37 بر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۵؛ ۴۴ (۸۶۸): ۱۱۰۳ – ۱۱۱۵.

مقدمه

پپتیدهای ضد میکروبی، گروهی از آنتی‌ژن‌های فعال هستند که به عنوان بخش مهمی از سیستم ایمنی ذاتی سلول‌های یوکاریوتی و نخستین خط دفاعی در برابر انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا شناخته می‌شوند (۱). از نظر بالینی، ۸۰ درصد از عفونت‌های باکتریایی انسان به شکل بیوفیلیم هستند (۲). بر اساس آمارهای مختلف، باکتری‌های موجود در بیوفیلیم می‌توانند ۱۰ تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر از حالت پلانکتونی خود در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان

دهند (۱). پپتیدهای ضد میکروبی به عنوان یک عامل ضدباکتری جلید، مزیت منحصر به فردی در فرایند مهار و از بین بردن بیوفیلیم باکتریایی دارند (۳).

پپتید ضد میکروبی LL-37 تنها عضو خانواده کاتلیسیدین‌ها است که در بدن انسان یافت می‌شود و به عنوان یک پپتید کوچک و فعال با عملکردهای مختلف شناخته می‌شود. LL-37 در انواع سلول‌های اپیتلیال، سلول‌های ایمنی، مایعات بدن، ترشحات ناشی از جراحات تروما و غیره در بدن انسان بیان و ترشح می‌شود. فعالیت ضدباکتریایی

۱- دکتر تخصصی باکتری شناسی پزشکی، آزمایشگاه کنترل غذا و دارو، معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دکتر تخصصی باکتری‌شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: فاتح رحیمی؛ دکتر تخصصی باکتری‌شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
Email: Fateh.rahimi@hotmail.com

روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم

به متی‌سیلین

جهت انجام این مطالعه نمونه‌گیری از فروردین‌ماه ۱۴۰۲ لغایت اسفندماه ۱۴۰۳ با جمع‌آوری ۱۷۳ پلیت کشت باکتریایی مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین که از نمونه‌های اداری بیماران مراجعه کننده به یک آزمایشگاه پاتوبیولوژی خصوصی در مرکز شهر تهران جداسازی شده بودند، انجام گرفت. تمامی نمونه‌ها با رعایت ملاحظات اخلاقی جمع‌آوری شدند و مطالعه تحت تصویب کمیته اخلاق دانشگاه انجام شد (کد اخلاق: IR.UI.REC.1402.110).

تمامی پلیت‌ها متعلق به ایزوله‌های غیر تکراری (یک ایزوله از هر بیمار) بودند و بیماران همگی با علائم معمول ابتلاء به عفونت اداری از قبیل کدورت و تغییر رنگ ادرار، سوزش به هنگام دفع، تکرر ادرار، درد در ناحیه کمر و پرینه، تب و گاهی لرز به آزمایشگاه مراجعه کرده بودند. در آزمایشگاه نیز در بررسی نمونه اداری بیماران، بیش از ۱۰ گلبول سفید و ۱۰۰۰۰۰ باکتری در هر میلی‌لیتر نمونه اداری گزارش شده بود. تمامی ایزوله‌های جمع‌آوری شده ابتدا در آزمایشگاه مورد نظر بر روی محیط ژلوز خون‌دار (HiMedia, Mumbai, India) کشت داده شده و پس از حصول اطمینان از خالص بودن کشت مورد نظر، یک کلنی از هر ایزوله به ویال‌های کرایو واجد محیط آگوست مغذی (Merck, Darmstadt, Germany) و گلیسرول منتقل و در فریزر -۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس ویال‌ها به صورت ماهانه و با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه اصفهان منتقل شدند.

در آزمایشگاه باکتری‌شناسی نیز، در ابتدا از هر ایزوله ارسال شده کشت مجدد بر روی محیط ژلوز (Merck, Darmstadt, Germany) Baird Parker داده شد. پس از مشاهده کلنی‌های خالص و سیاه براق واجد هاله کدر در اطراف آن، یک کلنی از کشت تازه هر ایزوله مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس بر روی محیط ژلوز مولر هیتتون (Merck, Darmstadt, Germany) واجد ۶ میکروگرم/میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین (Sigma-Aldrich, GmbH, Germany) و ۲ درصد نمک بر اساس دستورالعمل Clinical and laboratory standards institute (CLSI) کشت داده شد. کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط واجد آنتی‌بیوتیک به روش غربالگری آگار به عنوان سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین انتخاب شدند (۱۲). به منظور تأیید سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از آزمون‌های PCR جداگانه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژنهای *mecA*، *nucA* و *mecC* بر اساس دستورالعمل پیشین رحیمی و همکاران استفاده شد (۱۳).

LL-37 بالاتر از آنتی‌بیوتیک‌های معمول است و حداقل غلظت مهار کننده از رشد آن مشابه فلوروکینولون‌هایی مانند افلوکساسین و سیپروفلوکساسین و بالاتر از نورفلوکساسین و انوکساسین است (۴، ۵). مطالعات موجود نشان داده‌اند که LL-37، به عنوان یک آنتی‌بیوتیک با منشاء اندوژن، نه تنها اثر ضد میکروبی بسیار خوبی بر استافیلوکوکوس اورئوس (به حالت پلانکتونی)، سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیا کلائی و سایر باکتری‌های بیماری‌زا دارد، بلکه واجد فعالیت مهار کننده علیه بیوفیلم ناشی از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، سودوموناس آئروژینوزا و اسیتوباکتر بومانی نیز می‌باشد (۱، ۶-۸).

استافیلوکوکوس اورئوس، یکی از شایع‌ترین میکروارگانیسم‌هایی است که عامل اصلی ایجاد طیف وسیعی از عفونت‌ها از جمله باکتری، اندوکاردیت عفونی، ذات‌الریه و عفونت‌های پوست و بافت نرم محسوب می‌شود. عفونت‌های مرتبط با استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA (Methicillin resistant *S. aureus*) سالانه در ایالات متحده آمریکا باعث مرگ ۱۱ هزار نفر و تحمیل هزینه‌ای بالغ بر ۱۴/۵ میلیارد دلار به سیستم‌های بهداشتی و بیماران می‌شود (۹).

امروزه ونکومایسین به عنوان داروی استاندارد و معمول جهت درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما استفاده مکرر از آن منجر به ایجاد مقاومت ضد میکروبی و گسترش آن در میان سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و گونه‌های مختلف اتروکوکوس شده است (۱۰). سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس همچنین از جمله رایج‌ترین میکروارگانیسم‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم در دستگاه اداری می‌باشند. اعتقاد بر این است که بسیاری از عفونت‌های مزمن در انسان، از جمله عفونت‌های اداری، با تشکیل بیوفیلم مرتبط هستند (۱۱). به دلیل توانایی استافیلوکوکوس اورئوس در تشکیل بیوفیلم که می‌تواند باعث تغییر پاسخ ایمنی شود، زمان مجاورت باکتری در معرض دارو کاهش پیدا کرده و با تأخیر در درمان عفونت منجر به مزمن شدن آن و در نهایت تبدیل عفونت ساده تک‌گیر به عفونت عودشونده می‌شود (۹). با توجه به تفاوت‌های گزارش شده در الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توانایی تشکیل بیوفیلم در سویه‌های MRSA در مناطق مختلف، بررسی اثر ضد بیوفیلمی پپتید LL-37 بر ایزوله‌های ایرانی می‌تواند اطلاعات جدید و بومی ارزشمندی در زمینه کارایی این پپتید فراهم کند. بر این اساس، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر کاتالیزدین LL-37 بر سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مولد بیوفیلم جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت اداری مراجعه‌کننده به یک آزمایشگاه پاتوبیولوژی در شهر تهران در سال‌های ۱۴۰۳-۱۴۰۲ به انجام رسیده است.

چاهک‌ها از ترکیب رنگ‌بر اتانول (۸۰) - استن (۲۰) استفاده شد. در نهایت، جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانشگر الیزا (Stat Fax 2000, Awareness Technologies, USA) قرائت شد. بر اساس نتایج حاصل سویه‌ها به ۴ دسته بیوفیلم منفی ($OD_{570} \leq ODc$)، بیوفیلم قوی ($1 \geq OD_{570}$)، بیوفیلم متوسط ($1 \leq OD_{570} < 2$) و بیوفیلم ضعیف ($OD_{570} < 2$) تقسیم‌بندی شدند.

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

پس از تعیین سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین مولد بیوفیلم، حساسیت آنها نسبت به دیسکهای (Liofilchem, Italy) پنی سیلین (۱۰ واحد)، اریترومايسين (۱۵ میکروگرم)، آزیترومایسین (۱۵ میکروگرم)، نیتروفورانتوئین (۳۰۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، لووفلوکساسین (۵ میکروگرم)، تراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، مینوسایکلین (۳۰ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، لینزولاید (۳۰ میکروگرم)، کینوپریستین - دلفوپریستین (۱۵ میکروگرم)، نری متوپریم - سولفامتوکسازول (۱/۲۵ - ۲۳/۷۵ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم) و ریفاپین (۵ میکروگرم) به روش انتشار دیسک و با استفاده از محیط ژلوز مولر هیتون (Darmstadt, Germany) بر اساس استانداردهای CLSI (۲۰۲۳) تعیین گردید (۱۲). همچنین، به منظور بررسی مقاومت به ونکومايسين از روش broth microdilution بر اساس استانداردهای CLSI استفاده شد (۱۲). برای سویه‌های مقاوم و واجد مقاومت بینابینی حداقل غلظت ممانعت از رشد ونکومايسين به ترتیب $16 \geq$ و $8-4$ میکروگرم در نظر گرفته شد.

بررسی حضور ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم در سویه‌های

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مولد بیوفیلم

در این مطالعه جهت بررسی حضور ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم (*cna*, *sdrE*, *sdrD*, *sdrC*, *clfA*, *fmbpA*, *icaD*, *icaA*) در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین بیوفیلم مثبت از آزمون‌های multiplex-PCR با پرایمرهای اختصاصی هر ژن بر اساس چرخه‌ی حرارتی و پروتکلی که پیشتر معرفی شده بود، استفاده شد (۱۵، ۱۶).

پروفاژ تائینگ، SCCmec تائینگ و ccr تائینگ سویه‌های

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مولد بیوفیلم

جهت تعیین حضور پروفاژ تائینگ‌های مختلف SGB, SGA, SGFb, SGFa, SGD, SGL و همچنین تعیین الگوهای پروفاژی در میان سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مولد بیوفیلم از آزمون multiplex-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر تایپ بر اساس پروتکلی که پیشتر توسط

همچنین در این مطالعه استخراج DNA از هر ایزوله باکتریایی به منظور انجام آزمون‌های مولکولی با روش جوشاندن انجام گرفت (۱۴). برای این منظور، یک لوپ از کشت تازه و خالص هر ایزوله باکتریایی در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به خوبی حل و ورتکس گردید. سپس ویال واجد سوسپانسیون به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه ترموبلاک (NP-1000، شرکت پدیده نوژن پارس، مشهد، ایران) با دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. در نهایت ویال‌ها با استفاده از سانتریفیوژ (ارمغان طب ایرانیان، تهران، ایران) در $13000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و از مایع رویی جهت انجام PCR استفاده شد.

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم در سویه‌های استافیلوکوکوس

اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

جهت بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری از ترکیبی از دو روش کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتیر پلیت، استفاده گردید (۱۱). برای انجام بررسی به روش کیفی، پس از آماده‌سازی محیط ژلوز قرمز کنگو یک کلنی از کشت تازه و خالص هر سویه باکتریایی بر روی محیط به صورت خطی کشت داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از آن جهت حصول بهتر نتیجه پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت نیز در دمای اتاق نگهداری شدند. در نهایت، کلنی‌ها بر اساس ظهور رنگ‌های قرمز روشن، قرمز تیره و سیاه رنگ به عنوان مورفوتایپ‌های اسلایم منفی، اسلایم مشکوک (متغیر) و اسلایم مثبت طبقه‌بندی شدند و سویه‌های اسلایم مثبت و اسلایم مشکوک جهت بررسی به روش کمی انتخاب شدند. در روش کمی میکروتیتیر پلیت، ابتدا محیط آبگوشت تریپتیک سوی (Scharlau, Spain) واجد ۰/۲۵ درصد سوکروز آماده گردید. سپس از کشت تازه از هر سویه منتخب (اسلایم مثبت و اسلایم مشکوک)، کدورتی معادل نیم مک فارلند از هر کشت تهیه شد. در مرحله بعد، غلظت ۱:۱۰۰ (معادل 10^6 CFU/mL) از هر سویه آماده شد و ۲۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به صورت سه تایی در چاهک‌های پلیت ۹۶ خلنه تلقیح شدند. همچنین از محیط بدون باکتری نیز به عنوان شاهد استفاده گردید. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، محتویات چاهک‌ها تخلیه گردید و جهت شست و شوی هر چاهک از سرم فیزیولوژی استریل استفاده شد. سپس هر چاهک با استفاده از رنگ کریستال ویوله (Sigma-Aldrich, GmbH, Germany) در ۰/۳۶ درصد به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. پس از تخلیه رنگ، مجدداً شستشو با استفاده از آب مقطر انجام گرفت. جهت انحلال رنگ‌های چسبیده به بیوفیلم متصل به دیواره

در نظر گرفته شدند و هر تست با سه مرتبه تکرار انجام گرفت. در نهایت جهت بررسی اثر LL-37 بر مهار تشکیل بیوفیلم از فرمول زیر استفاده گردید (۱۹):

$$100 \times \frac{[ODc-ODs] - [ODt-ODnc]}{[ODc-ODs]} = \text{درصد}$$

مهار تشکیل بیوفیلم

بررسی اثر کاتلیسیدین LL-37 بر تخریب بیوفیلم سویه‌های

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

اثر تخریبی LL-37 بر بیوفیلم تشکیل شده توسط ۶ سویه منتخب در داخل چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه نیز به روش میکروتیتر پلیت، تعیین گردید (۱). برای این منظور، ابتدا بر اساس پروتکل پیشین بیوفیلم در داخل چاهک‌ها تشکیل شد و پس از تخلیه محتویات چاهک‌ها، به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت مورد نظر LL-37 (Sub-MIC) اضافه گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس محتویات چاهک‌ها همانند پروتکل پیشین تخلیه و پلیت‌ها پس از شستشو و رنگ‌آمیزی با استفاده از دستگاه خوانشگر الیزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفتند. برای محاسبه اثر تخریبی غلظت مورد نظر بر بیوفیلم تشکیل شده نیز از فرمول پیشین استفاده گردید (۱۹).

در این مطالعه جهت رسم تمامی نمودارها و همچنین انجام آنالیز آماری از نرم‌افزار GraphPad Prism 8 و آزمون Chi-square استفاده گردید.

یافته‌ها

شناسایی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

تمامی ۱۷۳ ایزوله مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین که در آزمایشگاه پاتوبیولوژی مورد شناسایی اولیه قرار گرفته بودند، بر روی محیط ژلوز Baird-Parker کلنی‌های سیاه براق همراه با هاله کدر تشکیل دادند. این کلنی‌ها در آزمون‌های PCR نیز واجد باندهای اختصاصی برای ژن‌های *nucA* و *mecA* بودند و به عنوان سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در این مطالعه مورد تأیید قرار گرفتند. همچنین ژن *mecC* در هیچکدام از سویه‌ها شناسایی نشد. از مجموع ۱۷۳ سویه مورد بررسی در مطالعه‌ی حاضر، ۶۲ (۱۰۸ سویه) و ۳۸ (۶۵ سویه) سویه‌ها به ترتیب از نمونه‌های خانم‌ها و آقایان جداسازی شدند.

بررسی تشکیل بیوفیلم در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس

مقاوم به متی‌سیلین

نتایج آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو نشان داد که از مجموع ۱۷۳ سویه مورد مطالعه ۱۰۵ (۶۱ درصد) واجد کلنی‌هایی با مورفوتایپ قرمز روشن بودند که به عنوان سویه‌های اسلایم منفی از

Rahimi و همکاران ارائه شده بود، استفاده شد (۱۷). جهت SCCmec تایپینگ و *ccr* تایپینگ سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین واجد ژن *mecA* دو آزمون multiplex-PCR جداگانه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (SCCmec) تایپ‌های I-V و *ccr* تایپ‌های ۵-۱ و بر اساس دستورالعمل و چرخه‌ی حرارتی پیشین، مورد استفاده قرار گرفت (۱۸).

تعیین حداقل غلظت مهارکننده از رشد کاتلیسیدین LL-37

جهت تعیین حداقل غلظت مهارکننده از رشد LL-37 از روش broth microdilution بر اساس دستورالعمل CLSI اقدام شد (۱۲). بر این اساس، در پلیت‌های ۹۶ خانه، سریال رقت از غلظت ۱-۱۰۲۴ میکروگرم/میلی‌لیتر از LL-37 (Proteo Genix, France) تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت مورد نظر با ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت 10⁶ CFU/mL ۶ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مولد بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف مواجه شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شده و پس از این مدت حداقل غلظت مهار کننده از رشد LL-37 بر سویه‌های باکتریایی تعیین گردید.

بررسی اثر کاتلیسیدین LL-37 بر تشکیل بیوفیلم در سویه‌های

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مولد بیوفیلم

پس از تعیین حداقل غلظت مهارکننده از رشد کاتلیسیدین LL-37 بر سویه‌های منتخب، جهت بررسی اثر LL-37 بر تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از غلظت پایتیر از حداقل غلظت مهارکننده رشد به دست آمده (Sub-MIC) و آزمون کمی میکروتیتر پلیت استفاده گردید (۱). برای این منظور بر اساس آنچه که پیشتر در مورد آزمون کمی میکروتیتر پلیت مطرح شد، پس از تهیه غلظت ۱:۱۰۰ باکتری در محیط آبگوشت تربیتیک سوی واجد ۰/۲۵ درصد سوکروز، ۱۰ میکرولیتر از غلظت مورد نظر از LL-37 به ۹۹۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده اضافه شد و در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر از این ترکیب به صورت سه تایی در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه تلقیح شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، محتویات چاهک‌ها تخلیه و سپس شستشو و رنگ‌آمیزی با روشی که پیش‌تر ذکر شد، صورت گرفت. در نهایت جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمون از چاهک‌های محتوی محیط کشت و غلظت‌های مختلف LL-37 به عنوان کنترل منفی (ODnc) و از چاهک‌های واجد سوسپانسیون باکتریایی LL-37 آب مقطر استریل به عنوان کنترل مثبت (ODc)، استفاده گردید. همچنین، چاهک‌های حاوی باکتری تیمار شده با LL-37 به عنوان ODt و چاهک‌های محتوی محیط کشت نیز به عنوان بلانک (ODs)

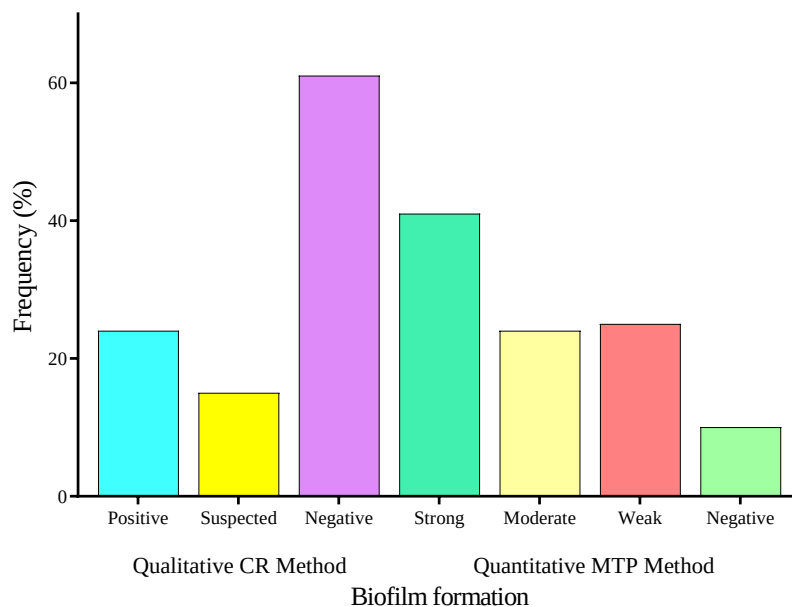
در بازه‌های سنی ۶۱-۷۰ (۳۱ درصد)، ۸۰-۷۱ سال (۲۶ درصد)، ۶۰-۵۱ سال (۱۸ درصد) و ۴۱-۵۰ (۱۳ درصد) جداسازی گردید (جدول ۱). در آقایان ۲۶، ۲۶ و ۲۲ درصد سویه‌های از بیماران در بازه‌های سنی ۶۱-۷۰، ۸۰-۷۱ و ۴۱-۵۰ سال و در خانم‌ها، ۳۱، ۲۶ و ۱۸ درصد سویه‌ها به ترتیب از بیماران در بازه‌های سنی ۶۱-۷۰ سال، ۸۰-۷۱ و ۵۱-۶۰ سال جداسازی شدند.

پروفاژ تایپینگ، SCCmec تایپینگ و ccr تایپینگ سویه‌های

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مولد بیوفیلم

در مطالعه‌ی حاضر، تمامی پروفاژ تایپ‌های مورد نظر به استثناء پروفاژ تایپ SGD در میان ۶۱ سویه مولد بیوفیلم مورد بررسی شناسایی شدند. تمامی سویه‌های حامل پروفاژ تایپ SGF و دو ساب تایپ SGFa و SGFb بودند. همچنین، دو پروفاژ تایپ SGA و

روند بررسی خارجی شدند. همچنین از ۶۸ سویه باقی مانده ۴۱ سویه (۲۴ درصد) و ۲۷ سویه (۱۵ درصد) نیز به ترتیب با ظهور کلنی‌هایی با مورفوتایپ‌های سیاه رنگ و قرمز تیره به ترتیب به عنوان سویه‌های اسلایم مثبت و اسلایم مشکوک (متغیر) شناسایی شدند (شکل ۱). از طرف دیگر، نتایج آزمون کمی میکروتیتر پلیت نشان داد که از مجموع ۶۸ سویه اسلایم مثبت و اسلایم مشکوک منتخب، ۷ سویه (۱۰ درصد) بیوفیلم منفی بودند ($OD_{570} \leq OD_c$). همچنین، ۴۱ (۲۸ سویه)، ۲۴ (۱۶ سویه) و ۲۵ (۱۷ سویه) درصد سویه‌ها به ترتیب به عنوان مولد بیوفیلم قوی، بیوفیلم متوسط و بیوفیلم ضعیف طبقه‌بندی شدند (شکل ۱). علاوه بر این، در مجموع ۴۲ (۶۹ درصد) و ۱۹ (۳۱ درصد) سویه به ترتیب متعلق به نمونه‌های خانم‌ها و آقایان بود ($P < 0.0001$). همچنین، بیشترین تعداد سویه‌ها به ترتیب از بیماران



شکل ۱. درصد فراوانی تشکیل بیوفیلم در میان سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین.

جدول ۱. فراوانی سویه‌های بیوفیلم مثبت در نمونه‌های ادراری جداسازی شدن از نمونه‌های آقایان و خانم‌ها بر اساس سن.

سن	آقایان (درصد)	خانمها (درصد)	تعداد (درصد)	P
۱-۱۰	۱ (۵)	۰	۱ (۲)	۰/۰۵۹۴
۱۱-۲۰	۰	۳ (۷)	۳ (۵)	۰/۰۱۴۰
۳۱-۴۰	۱ (۵)	۲ (۵)	۳ (۵)	۰/۹۹۹۹
۴۱-۵۰	۴ (۲۲)	۴ (۱۰)	۸ (۱۳)	۰/۰۳۲۷
۵۱-۶۰	۳ (۱۶)	۸ (۱۹)	۱۱ (۱۸)	۰/۷۱۰۲
۶۱-۷۰	۵ (۲۶)	۱۴ (۳۳)	۱۹ (۳۱)	۰/۳۵۲۳
۷۱-۸۰	۵ (۲۶)	۱۱ (۲۶)	۱۶ (۲۶)	۰/۹۹۹۹
تعداد (درصد)	۱۹ (۳۱)	۴۲ (۶۹)	۶۱	<۰/۰۰۰۱

اکتسابی از بیمارستان نیز به ترتیب محدود به ۳۱، ۱۲ و ۵ سویه بود.

تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های استافیلوکوکوس

اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مولد بیوفیلم

بر اساس نتایج حاصل از آزمون انتشار دیسک جهت تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشخص شد که تمامی سویه‌ها نسبت به پنی سیلین مقاوم بودند و ۱۳ سویه (۲۱ درصد) نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های دیگر حساسیت نشان دادند (جدول ۳). این سویه‌ها واجد SCCmec تایپهای IVc و V، ccr تایپ‌های ۲ و ۵ و الگوهای پروفاژی ۱ و ۲ بودند که به عنوان سویه‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین اکتسابی از جامعه طبقه‌بندی شده بودند. در مقابل، ۷۴، ۷۲، ۷۰، ۶۷، ۶۶ و ۶۱ درصد سویه‌ها نیز به ترتیب مقاوم به اریترومايسين، سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین، کلیندامایسین، تتراسایکلین، آزیترومایسین و نیتروفرانتوئین بودند. از طرف دیگر، تمامی سویه‌های مورد مطالعه نسبت به کلرامفنیکل، کینوپریستین-

SGL نیز در ۲۱ درصد سویه‌ها (۱۳ سویه) شناسایی شدند و فراوانی پروفاژ تایپ SGB نیز محدود به ۴۶ سویه (۷۵ درصد) بود (جدول ۲). در مجموع ۴ الگوی پروفاژی در میان سویه‌ها شناسایی شد که الگوی شماره ۳ (شامل پروفاژ تایپ‌های SGB، SGF، SGFa و SGFB) به عنوان الگوی غلبه در این مطالعه تعیین گردید. همچنین، بر اساس نتایج حاصل از آزمون‌های SCCmec و ccr تایپینگ سویه‌ها مشخص گردید که تمامی چهار تایپ ccr و پنج SCCmec تایپ مورد نظر در این سویه‌ها حاضر بودند. بدین ترتیب که ۸ (۱۳ درصد) و ۵ (۸ درصد) سویه به ترتیب واجد SCCmec تایپ‌های V و IVc بودند و به ترتیب حامل ccr تایپ‌های ۵ و ۲ بودند که به عنوان سویه‌های اکتسابی از جامعه شناسایی شدند. همچنین، ۵۱، ۲۰ و ۸ درصد سویه‌ها نیز به ترتیب برای SCCmec تایپ‌های I، III و II مثبت بودند و به عنوان سویه‌های اکتسابی از بیمارستان طبقه‌بندی شدند. علاوه بر این فراوانی ccr تایپ‌های ۳، ۱ و ۲ در میان سویه‌های

جدول ۲. فراوانی پروفاژ تایپ‌ها و الگوهای پروفاژی در میان سویه‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مولد بیوفیلم.

الگو	SGA	SGB	SGF	SGFa	SGFb	SGL	تعداد	درصد	نوع سویه
۱	+	+	+	+	+	+	۱۰	۱۶	CA-MRSA
۲	+	-	+	+	+	+	۳	۵	CA-MRSA
۳	-	+	+	+	+	-	۳۶	۵۹	HA-MRSA
۴	-	-	+	+	+	-	۱۲	۲۰	HA-MRSA

جدول ۳. فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان سویه‌های استافیلوکوکوس/اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مولد بیوفیلم اکتسابی از بیمارستان و اکتسابی از جامعه.

P	تعداد (درصد)	CA-MRSA		HA-MRSA		آنتی‌بیوتیک
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	
۰/۰۰۰۱	۴۰ (۶۶)	۰	۰	۸۳	۴۰	آزیترومایسین
۰/۰۰۰۱	۴۵ (۷۴)	۰	۰	۹۴	۴۵	اریترومايسين
۰/۹۹۹۹	۶۱ (۱۰۰)	۱۰۰	۱۳	۱۰۰	۴۸	پنی سیلین
۰/۰۰۰۱	۳۲ (۵۳)	۰	۰	۶۷	۳۲	تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول
۰/۰۰۰۱	۴۲ (۶۷)	۰	۰	۸۸	۴۲	تتراسایکلین
۰/۰۰۰۱	۳۳ (۵۴)	۰	۰	۶۹	۳۳	جنتامایسین
۰/۰۰۰۱	۳۵ (۵۸)	۰	۰	۷۳	۳۵	ریفامپین
۰/۰۰۰۱	۴۴ (۷۲)	۰	۰	۹۲	۴۴	سیپروفلوکساسین
۰/۹۹۹۹	۰	۰	۰	۰	۰	کلرامفنیکل
۰/۰۰۰۱	۴۳ (۷۰)	۰	۰	۹۰	۴۳	کلیندامایسین
۰/۹۹۹۹	۰	۰	۰	۰	۰	کینوپریستین-دالفوپریستین
۰/۹۹۹۹	۰	۰	۰	۰	۰	لینزولاید
۰/۰۰۰۱	۴۴ (۷۲)	۰	۰	۹۲	۴۴	لووفلوکساسین
۰/۰۰۰۱	۲۸ (۴۶)	۰	۰	۵۸	۲۸	مینوسایکلین
۰/۰۰۰۱	۳۷ (۶۱)	۰	۰	۷۷	۳۷	نیتروفرانتوئین
۰/۹۹۹۹	۰	۰	۰	۰	۰	ونکومايسين

میکروگرم/میلی لیتر) LL-37 استفاده گردید (جدول ۵).

بررسی اثر کاتالیزدین LL-37 بر تشکیل بیوفیلم

جهت بررسی اثر LL-37 بر تشکیل بیوفیلم در سویه‌های /استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مولد بیوفیلم، در مجموع ۶ سویه بیوفیلم قوی (۲ سویه)، متوسط (۲ سویه) و ضعیف (۲ سویه) انتخاب شد و به ترتیب اثر غلظت‌های ۲۵۶، ۱۲۸ و ۱۶ میکروگرم/میلی لیتر LL-37 بر این سویه‌ها تعیین گردید. بر این اساس مشخص شد که هر ۳ غلظت به شکل معنی‌داری قادر به کاهش تشکیل بیوفیلم در سویه‌های منتخب بودند ($P < 0.0001$)، که این کاهش در سویه‌های با بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف به ترتیب ۵۰-۵۶ درصد، ۵۳-۵۲ درصد و ۵۶-۵۴ درصد بود (شکل ۲). بنابراین، کاهش بیوفیلم در سویه‌های مولد بیوفیلم قوی و متوسط تقریباً دو برابر بیشتر از سویه‌های با بیوفیلم ضعیف بود.

بررسی اثر کاتالیزدین LL-37 بر تخریب بیوفیلم

پس از بررسی اثر LL-37 بر تشکیل بیوفیلم، تأثیر این ترکیب بر تخریب بیوفیلم تشکیل شده توسط این سویه‌ها نیز به روش میکروتیتر پلیت تعیین گردید. بر این اساس مشخص شد که هر ۳ غلظت sub-MIC محاسبه شده به شکل معنی‌داری باعث تخریب بیوفیلم تشکیل شده توسط سویه‌های مولد بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف شدند ($P < 0.0001$) (شکل ۳). همچنین، این کاهش در سویه‌های با بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف به ترتیب ۵۰-۴۸، ۵۲-۴۹ و ۶۷-۶۴ درصد بود. به طور کلی این اثر تخریبی در سویه‌های با بیوفیلم ضعیف کمتر از سویه‌های مولد بیوفیلم قوی و متوسط بود.

دالفوپریستین، لینزولاید و ونکومايسين نیز حساسیت نشان دادند. همچنین، ۴۴ سویه (۷۲ درصد) نیز نسبت به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی بتا-لاکتام، ماکرولید و فلوروکینولون‌ها مقاوم بودند که به عنوان سویه‌های با مقاومت چندگانه (MDR (Multiple drug resistance) مورد شناسایی قرار گرفتند. نتایج آزمون حداقل غلظت مهارکننده آنتی‌بیوتیک ونکومايسين نشان داد که در تمامی ۶۱ سویه مورد بررسی $MIC \geq 1$ میکروگرم/میلی لیتر بود و هیچ کدام از سویه‌ها مقاومت کاهش یافته نیز نسبت به ونکومايسين نشان ندادند.

تعیین حضور ژن‌های مرتبط با بیوفیلم

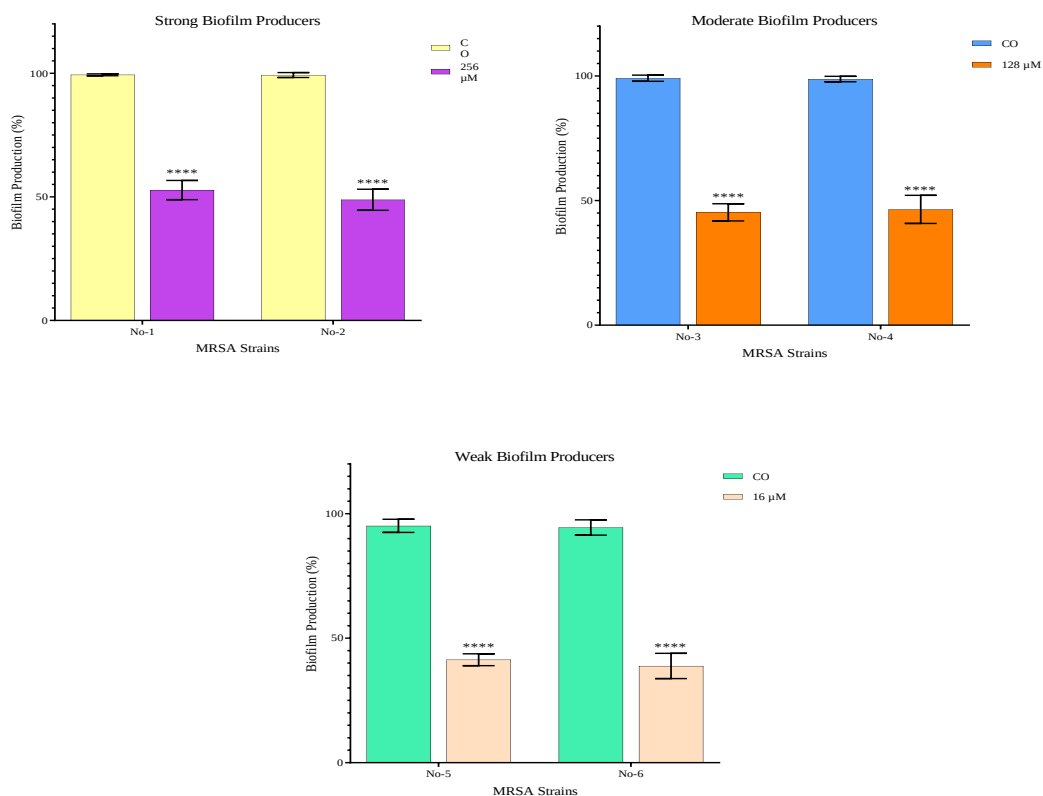
در این مطالعه ژن‌های *icaA* و *icaD* به ترتیب در ۸۲ و ۸۴ درصد سویه‌های بیوفیلم مثبت شناسایی شدند و ۷۵، ۷۴، ۸۵، ۷۲، ۸۰ و ۶۶ درصد سویه‌ها نیز حامل ژن‌های *sdrD*، *sdrC*، *clfA*، *fnbpA* و *sdrE* بودند (جدول ۴). همچنین، ژن‌های *icaD* و *icaA* در ۱۰۰ درصد سویه‌های مولد بیوفیلم قوی و متوسط حاضر بودند اما اختلاف معنی‌داری بین حضور سایر ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم در این دو دسته از سویه‌ها و همچنین سویه‌های مولد بیوفیلم ضعیف مشاهده شد ($P < 0.0001$).

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد کاتالیزدین LL-37

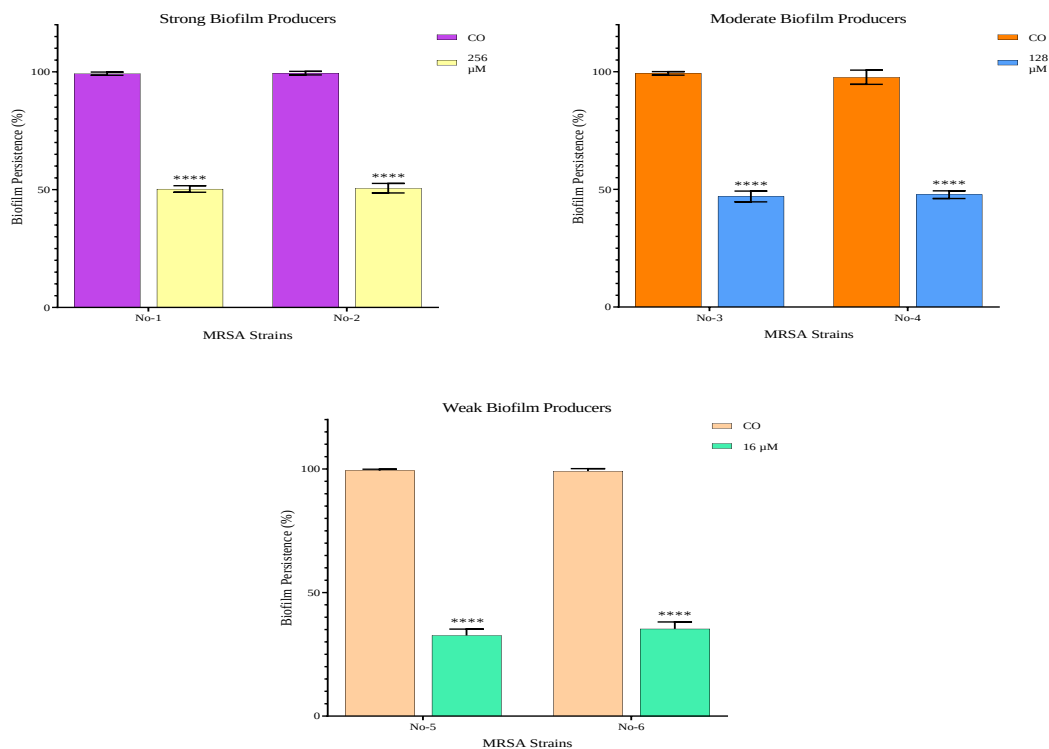
بر اساس نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد کاتالیزدین LL-37 به روش broth microdilution بر روی ۶ سویه مولد بیوفیلم مشخص شد که حداقل غلظت ممانعت از رشد این ترکیب در مورد سویه‌های با بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف به ترتیب برابر با ۲۵۶، ۳۲ و ۳۲ میکروگرم/میلی لیتر بود. بنابراین، برای انجام آزمون‌ها از غلظت‌های sub-MIC (۲۵۶، ۱۲۸ و ۱۶

جدول ۴. فراوانی ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم در میان سویه‌های مولد بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف.

ژن	سویه‌های مولد بیوفیلم قوی (درصد)	سویه‌های مولد بیوفیلم متوسط (درصد)	سویه‌های مولد بیوفیلم ضعیف (درصد)	تعداد کلی (درصد)
<i>icaA</i>	۲۸ (۱۰۰)	۱۶ (۱۰۰)	۶ (۳۵)	۵۰ (۸۲)
<i>icaD</i>	۲۸ (۱۰۰)	۱۶ (۱۰۰)	۷ (۴۱)	۵۱ (۸۴)
<i>sdrC</i>	۲۷ (۹۶)	۱۵ (۹۴)	۱۰ (۵۹)	۵۲ (۸۵)
<i>sdrD</i>	۲۴ (۸۶)	۱۳ (۸۱)	۷ (۴۱)	۴۴ (۷۲)
<i>sdrE</i>	۲۶ (۹۳)	۱۴ (۸۸)	۹ (۵۳)	۴۹ (۸۰)
<i>clfA</i>	۲۶ (۹۳)	۱۱ (۶۹)	۸ (۴۷)	۴۵ (۷۴)
<i>cna</i>	۲۴ (۸۶)	۹ (۵۶)	۵ (۲۹)	۳۸ (۶۲)
<i>fnbpA</i>	۲۷ (۹۶)	۱۲ (۷۵)	۷ (۴۱)	۴۶ (۷۵)
تعداد (درصد)	۲۸ (۴۶)	۱۶ (۲۶)	۱۷ (۲۸)	۶۱



شکل ۲. بررسی اثر غلظت‌های sub-MIC کاتلیسیدین LL-37 بر تشکیل بیوفیلم در سویه‌های مولد بیوفیلم قوی (۱ و ۲)، متوسط (۳ و ۴) و ضعیف (۵ و ۶).



شکل ۳. بررسی اثر غلظت‌های sub-MIC کاتلیسیدین LL-37 بر تخریب بیوفیلم در سویه‌های مولد بیوفیلم قوی (۱ و ۲)، متوسط (۳ و ۴) و ضعیف (۵ و ۶).

جدول ۵. حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد کاتلیسیدین LL-37 بر سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مولد بیوفیلم.

شماره سویه	بیوفیلم	اسلایم	نوع سویه	الگوی پروفایلی	SCCmec تایپ	MIC LL-37 (µg/ml)
۱	قوی	مثبت	HA-MRSA	۳	III	۵۱۲
۲	قوی	مثبت	HA-MRSA	۳	I	۵۱۲
۳	متوسط	مثبت	HA-MRSA	۳	II	۲۵۶
۴	متوسط	مثبت	HA-MRSA	۴	III	۲۵۶
۵	ضعیف	مشکوک	CA-MRSA	۱	V	۳۲
۶	ضعیف	مشکوک	CA-MRSA	۲	IVc	۳۲

بحث

در این مطالعه از مجموع ۶۱ سویه بیوفیلم مثبت به روش کمی میکروتیتر پلیت، ۴۱ درصد مولد بیوفیلم قوی، ۲۴ درصد مولد بیوفیلم متوسط و ۲۵ درصد مولد بیوفیلم ضعیف بودند. تاکنون نتایج مختلفی در مورد فراوانی این سویه‌ها در شهرهای تهران، اصفهان و کرج گزارش شده است (۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۹). ژن‌های *icaA* و *icaD* در ۱۰۰ درصد سویه‌های با بیوفیلم قوی و متوسط حاضر بودند اما شیوع آنها در سویه‌های مولد بیوفیلم ضعیف به ترتیب ۳۵ و ۴۱ درصد بود. با توجه به فراوانی یکسان آن‌ها در سویه‌های مولد بیوفیلم قوی و متوسط، احتمالاً سایر ژن‌ها نیز می‌توانند در این زمینه حائز اهمیت باشند و وجود ژن‌های رمزکننده PIA/PNAG تنها عامل تعیین کننده در توانایی تشکیل بیوفیلم نیست (۱۸، ۲۰).

در مطالعاتی در چین در سال ۲۰۲۴، تفاوت خاص و معناداری در میان سویه‌های با بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف از نظر فراوانی ژن‌های *icaA* و *icaD* مشاهده نشد که این آمار در مورد ژن *icaA* به ترتیب ۱۰۰، ۹۹/۴ و ۹۹/۸ درصد و در ارتباط با ژن *icaD* نیز به ترتیب ۱۰۰، ۹۹/۴ و ۹۹/۸ درصد بود که مغایر با یافته‌های ما بود (۲۰).

همچنین، نکته قابل توجه حضور ۹۹/۷ و ۱۰۰ درصدی این دو ژن در سویه‌های با بیوفیلم منفی بود. در مقابل، در مطالعه‌ی دیگری در چین در سال ۲۰۲۰، تفاوت معناداری در ارتباط با ژن *icaD* در سویه‌های مولد بیوفیلم قوی و ضعیف گزارش شد که منطبق با مطالعه‌ی حاضر بود (۲۱).

علاوه بر این، در ارتباط با ژن‌های *sdrC*، *sdrD* و *sdrE* نیز فراوانی این ژن‌ها در سویه‌های مولد بیوفیلم قوی و متوسط اختلاف معناداری با سویه‌های با بیوفیلم ضعیف داشت که این یافته بیشتر در دیگر مطالعات نیز گزارش شده است (۲۰-۲۲)؛ همچنین مشابه با سایر گزارشات ژن *sdrC* نیز فراوان‌ترین ژن بود (۱۶) اما در مطالعه‌ی Yu و همکاران ژن *sdrE* ژن غالب بود (۲۰).

با توجه به اینکه در سویه‌های با بیوفیلم ضعیف ژن‌های *sdrD* و *sdrE* فراوانی بالاتری نسبت به ژن *sdrC* داشتند و بر اساس یافته Yu و همکاران در چین در سال ۲۰۲۴ (۲۰)، می‌توان اعلام داشت

که این دو ژن از اهمیت بالاتری در تشکیل بیوفیلم در سویه‌های با قدرت پایین تشکیل بیوفیلم برخوردار می‌باشند، در حالیکه فراوانی سه ژن مذکور در سویه‌های با بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف اختلاف معناداری نداشتند. علاوه بر این، ژن‌های *cna*، *fnbA* و *clfA* که به عنوان ادهسین‌ها شناخته می‌شوند نیز در سویه‌های با قدرت بیوفیلم بالا و متوسط شیوع معناداری در مقایسه با سویه‌های مولد بیوفیلم ضعیف داشتند که این موضوع پیشتر نیز گزارش شده است (۱۱، ۱۹).

همچنین، در ترکیه در سال ۲۰۲۰ فراوانی ژن‌های *cna*، *fnbA* و *clfA* به ترتیب ۹۸، ۸۷ و ۷۵ درصد اعلام شد که در مقایسه با شیوع ۶۲، ۷۵ و ۷۴ درصدی این ژن‌ها در مطالعه‌ی حاضر از فراوانی بالاتری برخوردار بود (۲۳). با توجه به اهمیت این ژن‌ها در اتصال به سطوح میزبان، این ژن‌ها می‌توانند در تشکیل بیوفیلم از طریق مسیری مستقل از پروتئین *ica* نیز ایفای نقش کنند (۱۱، ۱۹). از طرف دیگر، *cna* تنها ژن رمزکننده ادهسین متصل شونده به کلاژن است که در بسیاری از مطالعات در سویه‌های با بیوفیلم منفی با فراوانی بالایی گزارش شده است (۲۰).

از طرف دیگر، در ایران Khoramian و همکاران، اختلاف معناداری بین سویه‌های مختلف مولد بیوفیلم از نظر پراکندگی این ژن مشاهده نکردند (۲۴). بنابراین با توجه به تنوع بالا و اختلافات مشاهده شده در پراکندگی این ژن در سویه‌های با قدرت‌های متفاوت تشکیل بیوفیلم در نقاط مختلف، به نظر می‌رسد که این ژن از اهمیت بالایی در مقایسه با سایر ژن‌ها برای تشکیل بیوفیلم برخوردار نبوده و شاید بیشتر به عنوان یک ژن جانبی به تشکیل بیوفیلم در سویه‌ها کمک می‌کند.

در این مطالعه بر اساس نتایج حاصل از آزمون تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، مشخص شد که تمامی سویه‌ها نسبت به پنی‌سیلین مقاوم بودند و در مقابل هیچ مقاومتی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ونکوماکسین، کلرامفنیکل، لینزولاید و کینوپریستین-دالفوپریستین مشاهده نشد. این یافته در سایر مطالعات پیشین انجام گرفته در ایران نیز گزارش شده است (۱۱، ۱۵، ۱۷).

نتایج حاصل از اثر کاتلیسیدین LL-37 بر سویه‌های/استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مولد بیوفیلم مشخص شد که این ترکیب اثر ضد میکروبی قوی بر این سویه‌ها دارد و حداقل غلظت مهارکننده بر رشد در سویه‌های با قدرت تشکیل بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف کاملاً متفاوت بود (۵۱۲-۳۲ میکروگرم/میلی‌لیتر).

Noore و همکاران در سال ۲۰۱۳، نشان دادند که LL-37 اثرات ضدباکتریایی و کشندگی بسیار قوی در غلظت‌های نانومولار بر سویه‌های/استافیلوکوکوس اورئوس دارد (۲۹). بر این اساس مشخص شد که غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ نانومولار LL-37 می‌توانند اثر کشندگی به ترتیب بر ۹۰ و ۱۰۰ درصد سویه‌های/استافیلوکوکوس اورئوس داشته باشند.

همچنین، Wei و همکاران در سال ۲۰۲۱ گزارش دادند که LL-37 به عنوان یک عامل باکتریواستاتیک علیه سویه‌های/استافیلوکوکوس اورئوس شناخته می‌شود (۱). ما در این مطالعه نشان دادیم که غلظت‌های پایین‌تر از حداقل غلظت مهارکننده (sub-MIC) از LL-37 قادر به ممانعت از تشکیل بیوفیلم (۵۶-۴۶ درصد) و همچنین کاهش معنادار بیوفیلم تشکیل شده (۶۷-۴۸ درصد) در تمامی سویه‌های/استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مورد بررسی با توانایی تشکیل بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف بود. همسو با این یافته‌ها، Wei و همکاران نشان دادند که LL-37 اثر مهاری بر بیوفیلم تشکیل شده دارد (۱).

همچنین، Mishra و همکاران مشاهده کردند که LL-37 قادر به مهار اتصال باکتری یا تخریب بیوفیلم از پیش تشکیل شده نیست، اما غلظت ۳/۱ میکرومولار این ترکیب باعث کاهش ۵۰ درصدی تشکیل بیوفیلم شد (۳۰). در مطالعه‌ی دیگری Shurko و همکاران دریافتند که LL-37 تنها قادر به کاهش ۵۰ درصدی تشکیل بیوفیلم سویه‌های/استافیلوکوکوس اورئوس بود و هیچگونه تأثیری بر تخریب بیوفیلم تشکیل شده نداشت، در حالیکه پپتیدهای LL-17 و LL-13 به طور کامل باعث مهار تشکیل و همچنین تخریب تقریباً کامل بیوفیلم شدند (۹).

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های حاصل از این مطالعه، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کاتلیسیدین انسانی LL-37 به عنوان یک پپتید ضد میکروبی، دارای اثر کشندگی بر سویه‌های/استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مولد بیوفیلم است. این پپتید قادر به کاهش معنادار تشکیل بیوفیلم و همچنین تخریب شدید بیوفیلم تشکیل شده توسط این سویه‌ها می‌باشد و این اثرات کاملاً مرتبط با قدرت تشکیل بیوفیلم در این سویه‌ها هستند. با توجه به اینکه این ترکیب در تمامی سویه‌های واجد و فاقد اپرون *ica* در این مطالعه توانست اثرات ضدبیوفیلمی خود را

همچنین، در این سویه‌ها مقاومت بیش از ۶۰ درصد نسبت به اریترومايسين، سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین، کلیندامایسین، تتراسایکلین، آزیترومایسین و نیتروفرانتوئین به دست آمد که این آمار به طور معناداری پایین‌تر از سایر مطالعات در سال‌های گذشته (۱۳، ۱۵) و تاحدودی منطبق بر گزارش Rahimi و همکاران در سال ۲۰۲۴ بود (۱۹). دلیل این اختلاف مشاهده شده می‌تواند ناشی از فراوانی بالای (۲۱ درصد) سویه‌های/استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین اکتسابی از جامعه در این مطالعه باشد. این سویه‌ها که واجد دو SCCmec تایپ IV و V و همچنین پروفاز تایپ SGA بودند نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه به استثناء پنی‌سیلین حساس بودند که مشابه سایر مطالعات بود (۱۴، ۱۵، ۱۸، ۲۵، ۲۶).

اما در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۱ مطرح گردید که سویه‌های اکتسابی از جامعه علاوه بر پنی‌سیلین نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها نیز مقاوم بوده و الزاماً ژن *pvl* نیز مختص سویه‌های اکتسابی از جامعه نبوده و در میان سویه‌های اکتسابی از بیمارستان نیز شایع است. بنابراین انتخاب این ژن به عنوان شاخص سویه‌های اکتسابی از جامعه نیز مورد ابهام قرار گرفت (۲۷). فراوانی این سویه‌ها در این مطالعه بالاتر از سایر گزارشات از ایران می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی روند رو به رشد و گسترش این سویه‌ها در شهر تهران است که پیش‌تر شیوع این سویه‌ها در سال‌های گذشته در آن ۱۹-۳ درصد گزارش گردید (۷، ۱۱).

در مقابل، در سویه‌های اکتسابی از بیمارستان که حامل SCCmec تایپ‌های I-III بودند مقاومت آنتی‌بیوتیکی بسیار بالایی نسبت به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مشاهده شد و ۹۲ درصد سویه‌ها نیز واجد مقاومت چندگانه بودند که مؤید عدم کارایی آنتی‌بیوتیک‌های معمول جهت درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های/استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین اکتسابی از بیمارستان است. همچنین، کاهش فراوانی سویه‌های اکتسابی از بیمارستان و افزایش سویه‌های اکتسابی از جامعه می‌تواند یک هشدار جدی برای کنترل عفونت در بیمارستانها در شهر تهران باشد. این سویه‌ها از قدرت بیماری‌زایی بالایی در مقایسه با سویه‌های اکتسابی از بیمارستان برخوردار هستند و حضور پروفاز تایپ SGA، توانایی تولید لوکوسیدین پنتون-ولتاین و همچنین تولنایی بالایی جهت کسب مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی این سویه‌ها را مبدل به بیماری‌زاهای خطرناکتری در مقایسه با سویه‌های اکتسابی از بیمارستان نموده است که می‌تواند در آینده به یک معضل بهداشتی بسیار جدی برای بیماران و سیستم بهداشتی مبدل شود.

مطالعات اخیر نشان می‌دهند که LL-37 می‌تواند با تخریب غشای سلولی، اختلال در حد نصاب احساس (quorum sensing) و کاهش چسبندگی سلولی، تشکیل بیوفیلم را مهار کند (۲۸). براساس،

نتیجه‌گیری قطعی و کامل نیازمند مطالعه‌ای جامع‌تر جهت بررسی وجود تمامی ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم در این سویه‌ها و همچنین بررسی بیان آن‌ها با استفاده از آزمون Real-Time PCR می‌باشد.

یکی دیگر از محدودیت‌های این مطالعه، بالا بودن مقادیر MIC پپتید LL-37 است که ممکن است در شرایط فیزیولوژیک بدن قابل دستیابی نبوده و از نظر سمیت سلولی و کاربرد بالینی محدودکننده باشد. همچنین، دامنه وسیع مقادیر MIC مشاهده‌شده (۳۲ تا ۵۱۲ میکروگرم/میلی‌لیتر) نشان‌دهنده تفاوت قابل توجه در حساسیت سویه‌های MRSA به پپتید LL-37 است. این اختلاف ۱۶ برابری می‌تواند محدودیت مهمی برای کاربرد مستقیم بالینی ایجاد کند. لذا یافته‌های حاصل از بررسی اثر ضدبیوفیلمی پپتید LL-37 با توجه به حجم نمونه محدود و شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*)، ماهیت مقدماتی داشته و نیازمند تأیید از طریق مطالعات تکمیلی *in vivo*، بررسی اثر ترکیبی پپتید با آنتی‌بیوتیک‌ها، ارزیابی سمیت سلولی و کارآزمایی‌های بالینی است.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی با کد ۱۰۰۰۴ می‌باشد که در دانشگاه اصفهان به تصویب رسیده و با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان به انجام رسیده است.

نشان دهد؛ بنابراین به نظر می‌رسد که احتمالاً این اپرون به عنوان هدف LL-37 مطرح نیست و سایر ژن‌های دخیل در بیوفیلم از جمله آدهسین‌ها نیز می‌توانند به عنوان هدف این ترکیب مطرح باشند. با توجه به قدرت بالای ضد بیوفیلمی LL-37 بر سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین این ترکیب می‌تواند به عنوان یک راهکار درمانی امیدوارکننده در آینده بیشتر مورد توجه و بررسی قرار گیرد.

یکی از محدودیت‌های این مطالعه، استفاده از روش کیفی ژلوز قرمز کنگو برای غربالگری اولیه‌ی ایزوله‌ها بود. با توجه به حساسیت و ویژگی پایین این روش و عدم همخوانی کامل آن با روش استاندارد کمی میکروتیتر پلیت، احتمال حذف برخی از سویه‌های با تولنایی متوسط یا ضعیف در تشکیل بیوفیلم وجود دارد. در مطالعات آینده، پیشنهاد می‌شود تمامی ایزوله‌ها مستقیماً با روش میکروتیتر پلیت ارزیابی شوند تا نتایج دقیق‌تری به دست آید.

بر اساس اطلاعات نویسندگان، این مطالعه نخستین مطالعه از بررسی اثر ضدبیوفیلمی این ترکیب بر سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در ایران است که بر روی تعداد محدودی از سویه‌های جمع‌آوری شده از یک آزمایشگاه در شهر تهران به انجام رسیده است. از طرفی، محدود بودن تعداد سویه‌های ارزیابی‌شده در آزمون ضدبیوفیلمی پپتید LL-37 یکی از محدودیت‌های این پژوهش است که ممکن است بر میزان تعمیم‌پذیری نتایج تأثیر بگذارد. بنابراین،

References

1. Wei J, Cao X, Qian J, Liu Z, Wang X, Su Q, et al. Evaluation of antimicrobial peptide LL-37 for treatment of Staphylococcus aureus biofilm on titanium plate. *Medicine (Baltimore)* 2021; 100(44): e27426.
2. Cha J-O, Yoo JI, Yoo JS, Chung H-S, Park S-H, Kim HS, et al. Investigation of biofilm formation and its association with the molecular and clinical characteristics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Osong Public Health Res Perspect* 2013; 4(5): 225–32.
3. Zhang L-j, Guerrero-Juarez CF, Hata T, Bapat SP, Ramos R, Plikus MV, et al. Dermal adipocytes protect against invasive Staphylococcus aureus skin infection. *Science* 2015; 347(6217): 67–71.
4. Han W, Camesano TA. LL37-derived fragments improve the antibacterial potential of penicillin G and ampicillin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Antibiotics (Basel)* 2023; 12(9): 1398.
5. Friberg C, Haaber JK, Vestergaard M, Fait A, Perrot V, Levin BR, et al. Human antimicrobial peptide, LL-37, induces non-inheritable reduced susceptibility to vancomycin in Staphylococcus aureus. *Sci Rep* 2020; 10(1): 13121.
6. Kai-Larsen Y, Lüthje P, Chromek M, Peters V, Wang X, Holm Å, et al. Uropathogenic Escherichia coli modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial peptide LL-37. *PLoS Pathog* 2010; 6(7): e1001010.
7. Shi P, Gao Y, Lu Z, Yang L. Effect of antibacterial peptide LL-37 on the integrity of Acinetobacter baumannii biofilm. *J Southern Med Univ* 2014; 34(3): 426–9.
8. Stempel N, Neidig A, Nusser M, Geffers R, Vieillard J, Lesouhaitier O, et al. Human host defense peptide LL-37 stimulates virulence factor production and adaptive resistance in Pseudomonas aeruginosa. *PloS One* 2013; 8(12): e82240.
9. Shurko JF, Galega RS, Li C, Lee GC. Evaluation of LL-37 antimicrobial peptide derivatives alone and in combination with vancomycin against S. aureus. *J Antibiot (Tokyo)* 2018; 71(11): 971–4.
10. Li G, Walker MJ, De Oliveira DM. Vancomycin resistance in Enterococcus and Staphylococcus aureus. *Microorganisms* 2022; 11(1): 24.
11. Rahimi F, Katouli M, Karimi S. Biofilm production among methicillin resistant Staphylococcus aureus strains isolated from catheterized patients with urinary tract infection. *Microb Pathog* 2016; 98: 69–76.

12. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 33th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2023.
13. 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 [in Persian]. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine* 2023; 28(100): 43–56.
14. Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in sewage treatment plants in Tehran, Iran. *J Water Health* 2021; 19(2): 216–28.
15. 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.
16. Almaadhidy RAKJ, Lateef Al Meani SA. Estimation of biofilm components and prevalence of *sdr* genes among *Staphylococcus aureus* isolated from Anbar hospitals. *The Open Microbiology Journal* 2024; 18(1).
17. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Prophage and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Iran. *Arch Virol* 2012; 157(9): 1807–11.
18. Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characteristics of hospital-and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *J Med Microbiol* 2014; 63(6): 796–804.
19. Rahimi F, Khashei S. Evaluation of the nitric oxide effectiveness against biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infections in Tehran during 2021-2023. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine* 2024; 29(106): 33–53.
20. Yu J, Han W, Xu Y, Shen L, Zhao H, Zhang J, et al. Biofilm-producing ability of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinically isolated in China. *BMC Microbiol* 2024; 24(1): 241.
21. Chen L, Tang Z-Y, Cui S-Y, Ma Z-B, Deng H, Kong W-L, et al. Biofilm production ability, virulence and antimicrobial resistance genes in *Staphylococcus aureus* from various veterinary hospitals. *Pathogens* 2020; 9(4): 264.
22. Uribe-García A, Paniagua-Contreras GL, Monroy-Pérez E, Bustos-Martínez J, Hamdan-Partida A, Garzón J, et al. Frequency and expression of genes involved in adhesion and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* strains isolated from periodontal lesions. *J Microbiol Immunol Infect* 2021; 54(2): 267–75.
23. Demir C, Demirci M, Yigin A, Tokman HB, Yildiz SC. Presence of biofilm and adhesin genes in *Staphylococcus aureus* strains taken from chronic wound infections and their genotypic and phenotypic antimicrobial sensitivity patterns. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2020; 29: 101584.
24. Khoramian B, Jabalameli F, Niasari-Naslaji A, Taherikalani M, Emaneini M. Comparison of virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections. *Microb Pathog* 2015; 88: 73–7.
25. Rahimi F, Khashei S. Characteristics of prophage patterns and virulence gene profiles among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with diabetic foot infections in a referral hospital in Tehran, Iran. *Infect Epidemiol Microbiol* 2023; 9(1): 15–23.
26. 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. *Arch Clin Infect Dis* 2024; 19(3): e142081.
27. Bai Z, Chen M, Lin Q, Ye Y, Fan H, Wen K, et al. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and molecular characterization in Quanzhou, China. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 629681.
28. Svensson D, Nilsson B-O. Human antimicrobial/host defense peptide LL-37 may prevent the spread of a local infection through multiple mechanisms: an update. *Inflamm Res* 2025; 74(1): 36.
29. Noore J, Noore A, Li B. Cationic antimicrobial peptide LL-37 is effective against both extra-and intracellular *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(3): 1283–90.
30. Mishra B, Golla RM, Lau K, Lushnikova T, Wang G. Anti-staphylococcal biofilm effects of human cathelicidin peptides. *ACS Med Chem Lett* 2016; 7(1): 117–21.

Evaluation of the Antibiofilm Activity of Cathelicidin LL-37 on Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Strains Isolated from Patients with Urinary Infections

Sanaz Khashei¹, Fateh Rahimi²

Original Article

Abstract

Background: LL-37 peptide as a human Cathelicin is secreted in urinary tract and plays an important role in eradication of urinary infections with its antibiofilm activity. This study aimed to evaluate the antibiofilm activity of the human Cathelicidin LL-37 against biofilm-producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates.

Methods: During 2023-2025, 173 non-duplicate urinary isolates were collected from patients in a Tehran clinical laboratory and screened for MRSA using phenotypic methods and PCR targeting *nucA*, *mecA*, and *mecC*. Biofilm formation was first assessed on Congo red agar and then quantified by microtiter plate assay. Antimicrobial susceptibility was determined by disk diffusion per CLSI guidelines, while vancomycin MICs were measured using broth microdilution. Biofilm-associated genes, *SCCmec* and *ccr* types, and prophage patterns were identified by multiplex PCR. MICs of LL-37 were determined by broth microdilution, and sub-MIC levels were tested for inhibitory and disruptive effects on biofilm formation.

Findings: Among all 173 MRSA isolates, 61 (35%) were biofilm-positive. Genes *icaA* and *icaD* were detected in >80% of isolates. Prophage SGF and its subtypes were universal. *SCCmec* typing revealed that 79% of isolates (types I–III) were hospital-acquired (HA-MRSA) and 72% were multidrug-resistant. LL-37 demonstrated MIC values ranging from 32 to 512 µg/mL depending on biofilm strength. Sub-MIC concentrations significantly reduced biofilm formation (46-56%) and disrupted pre-formed biofilms (48–67%).

Conclusion: LL-37 demonstrated robust antibiofilm activity against MRSA isolates and may represent a promising adjunct or alternative therapeutic option for biofilm-associated UTIs.

Keywords: LL-37 peptide, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Biofilms, Urinary tract infection, Molecular typing

Citation: Khashei S, Rahimi F. Evaluation of the Antibiofilm Activity of Cathelicidin LL-37 on Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Strains Isolated from Patients with Urinary Infections. J Isfahan Med Sch 2026; 44(868): 1103- 15.

1- PhD of Medical Bacteriology, Laboratories of Food and Drug Control, Vice Chancellery for Food and Drug, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- PhD of Bacteriology, Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Fateh Rahimi, PhD of Bacteriology, Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran; Email: Fateh.rahimi@hotmail.com