مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۶، شماره ٤، مهر و آبان ۱٤۰۰(شماره پی در پی ۱٤۷)

تعیین فراوانی نسبی بیوفیلم، ژن‌های مرتبط با تشکیل آن و تعیین تنوع ژنتیکی(spa-type) *استافیلوکوکوس ارئوس*‌های جدا شده از آدنوئید و لوزه کودکان مبتلا به هایپرتروفی آدنوئید

صدیقه مرادی[۱]، غلامعباس سبز[۲]، سیده ندا خرم روز[۱]، نسیم میرزایی[۱]، سید رضا چراغ زاده[۲]، محمد امین قطعی[۳]، مرجان صلاحی[۱]، اصغر شریفی[۳]، فرزاد مظلومی راد[۱]، محسن نغماچی[۳]، مهدی میرزایی[٤]، سحر میلانی[۱]، سید سجاد خرم‌روز[۳]*

[۱]کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران،[۲]گروه گوش، حلق و بینی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران،[۳]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران،[٤]گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

تاریخ وصول: ۱٤۰۰/۰۵/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۰۷/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: هایپرتروفی آدنوئید یکی از مشکلات دوران کودکی است که باکتری‌ها در اتیولوژی آن دخیل هستند. هدف از این مطالعه تعیین فراوانی نسبی بیوفیلم و ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* و هم‌چنین تعیین الگوهای ژنوتیپی جفت ایزوله های *استافیلوکوکوس ارئوس* از آدنوئید و لوزه کودکان مبتلا به هایپرتوفی آدنوئید با روش Spa typing بود.

روش بررسی: این یک مطالعه توصیفی- مقطعی می‌باشد که در سال ۱۳۹۷- ۱۳۹٦ در بیمارستان امام سجاد شهر یاسوج، بر روی ۸٦ جفت ایزوله *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از لوزه و آدنوئید کودکان مبتلا به هایپرتورفی آدنوئید انجام شد. روش فنوتیپی توانایی *استافیلوکوکوس ارئوس* در تولید بیوفیلم سنجیده شد و با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) ژن‌های *icaA*، *icaD*، *fnbA* و *clfA* ارزیابی شدند. به منظور تایپینگ ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* از روش *spa* تایپینگ استفاده شد. داده‌ها با استفاده ازآزمون‌های آماری توصیفی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: *استافیلوکوکوس ارئوس*‌های جدا شده از آدنوئید و لوزه به ترتیب در ٤۹(۵۷ درصد) و ٤۰ (٤٦/۵ درصد) بیوفیلم مثبت بودند. در ٤۷ مورد جفت ایزوله‌های جدا شده از آدنوئید و لوزه از لحاظ تولید بیوفیلم مشابه بودند. بالاترین فراوانی ژنها مربوط به *fnbA* بود که در آدنوئید در ٦٤ درصد و در لوزه در در ٤۱/۹ درصد ایزوله‌ها شناسایی شد. در مطالعه حاضر ٤ نوع تیپ spa در *استافیلوکوکوس ارئوس* شامل تایپ t081 غالب‌ترین تایپ در ٦۷/۵ درصد، t701 در ۱۱/٦ درصد، t2419 در ۹/۳ درصد و t4870 در ۸/۲ درصد از ایزوله‌های آدنوئید شناسایی شدند. در مجموع ۷۹/٤۵ درصد جفت ایزوله آدنوئید و لوزه دارای تایپ‌بندی مشابهی بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به فراوانی نسبی تشکیل بیوفیلم، بیوفیلم اهمیت متوسطی در استقرار *استافیلوکوکوس ارئوس* در لوزه و آدنوئید بیماران دارد. هم‌چنین نقش ژن *fnbA* در مقایسه با سایر ژن‌های مورد مطالعه در تشکیل بیوفیلم بیشتر از سایرین بود. مشابهت بالای spa تایپ‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از آدنوئید و لوزه، نشان دهنده کلونیزاسیون اولیه باکتری در لوزه است و سپس به عنوان منبع عفونت برای آدنوئید عمل می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس ارئوس*، بیوفیلم، spa تایپینگ، آدنوئید

***نویسنده مسئول: سید سجاد خرم‌روز**، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی
Email: Khoramrooz@gmail.com

مقدمه

آدنوئیدها به عنوان اولین خط دفاعی میزبان در برابر میکروب‌های تنفسی مطرح است و نقش مهمی در پیشگیری از بعضی بیماری‌های عفونی و غیر عفونی دستگاه تنفسی فوقانی دارند(۱). بیماری‌های مربوط به آدنوئید و لوزه‌ها یک مشکل عمده در کودکان است و ممکن است نیاز به جراحی داشته باشد. برآورد شده که در سراسر جهان از هر ۱۰۰۰۰ کودک زیر ۱۵ سال ۱۲۰ــ٤٤ کودک(۱۳/۳ــ۷/۵ درصد) تحت عمل آدنوئیدکتومی و تونسیلکتومی قرار می‌گیرند. علاوه بر عوارض مرتبط با جراحی این عمل‌ها تأثیرات روانی و مالی بر بیماران و خانواده‌های آن‌ها دارد(۲). آدنوئید نقش مهمی در ارایه آنتی ژن‌ها و القا واکنش سیستم ایمنی علیه پاتوژن‌های تنفسی دارد(۳). باکتری‌های بیماری‌زا می‌توانند در بافت آدنوئید کلونیزه شوند و سپس این بافت می‌تواند به عنوان یک مخزن برای این پاتوژن‌ها عمل کند، هر چند که در این زمینه نیاز به پژوهش‌های بیشتری وجود دارد(٤). در کودکان مبتلا به عفونت‌های مکرر، تشکیل بیوفیلمبه وسیله باکتری‌های بیماری‌زا در آدنوئید و لوزه‌ها مشاهده شده است(٦ و٥). در بعضی از پژوهش‌ها نشان داده شده که *استافیلوکوکوس ارئوس* از آدنوئید کودکان مبتلا به هیپرتروفی آدنوئید جدا شده است(۸ و ۷). با پیشرفت علوم پزشکی، عفونت‌های مرتبط با بیوفیلمدر حال افزایش و گسترش است(۹). یکی از مکانیسم‌های اصلی توسعه عفونت‌های بیمارستانی توانایی تشکیل بیوفیلم است که باعث تسهیل چسبندگی باکتریایی به سطوح مختلفدستگاه‌ها پزشکی، می‌شود(۱۱ و۱۰). بیوفیلم اجتماعی از میکروارگانیسم‌های چسبنده به یکدیگر روی یک سطح هستند که به وسیله ماتریکس خارج سلولی پلیمری پوشیده شده‌اند(۱۲).[1] در *استافیلوکوکوس*‌ها، مولکول اصلی چسبندگی بین سلولی، ادهسین بین سلولی پلی ساکاریدی(PIA)[1] است. که به طور ساختاری، این مولکول، یک همو پلیمر با شارژ مثبت از N– استیل گلوکز آمین با پیوند(٦ – ١)β می‌باشد که به صورت رشته‌های فیبری روی سطح سلول این باکتری قرار گرفته است(۱۳). سنتز PIAبه وسیله لوکوس(*icaADBC*)[2]میانجی‌گری می‌شود. *icaA*و*icaD* نقش مهمی در تشکیل بیوفیلم دارند(١٤). گرچه بیان ژن *icaA* به تنهایی، فقط باعث قدری فعالیت آنزیم، می شود، ولی بیان هم‌زمان ژن‌های *icaA* و *icaD* منجر به بیان کامل ساختار کپسول پلی‌ساکاریدی می‌شوند(۱۵). چندین مطالعه دیگر نیز نقش پروتئین‌های متصل شونده به فیبرونکتین (*FnbA* A و *FnbB* B)، پروتئین‌های متصل شونده

1-Polysaccharide Intercellular Adhesin(PIA)
2-Inter Cellular Adhesion(Ica)

به فیبرینوژن(*Fib*)،پروتئین‌های متصل شونده به کلاژن(*Cna*) را در اتصال باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* به پروتئین‌های خارج سلولی میزبان نشان داده است(۱۵-۱۲). *استافیلوکوکوس ارئوس*، قادر است با واسطه بیوفیلم به بافت‌های میزبان از جمله آدنوئید، متصل شود(۱۷ و۱۶). بیوفیلم‌ها موجب کاهش فعالیت باکتری و نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها به داخل آن‌ها خواهد شد. بنابراین، پاکسازی باکتری‌ها به وسیله آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار مشکل خواهد بود. هم‌چنین، باعث فرار باکتری از سیستم ایمنی بدن میزبان خواهد شد. بنابراین بیوفیلم، به طور قابل توجهی بر درمان‌های پزشکی و کنترل عفونت تأثیر می‌گذارد، به نظر می‌رسد تعداد بیماری‌های مرتبط با بیوفیلم رو به افزایش است.

پژوهش‌ها نشان داده است که اثر بیماری‌های لوزه به تنهایی بر روی لوزه نیست و می‌تواند سایر مکان‌های آناتومیک مرتبط مثل سینوس‌های پارانازال، قسمت فوقانی دستگاه گوارش، آدنوئید و شیپور استاش را تحت تأثیر قرار دهد(۱۸). در مطالعه‌ای تایلان و همکاران بین میکروارگانیسم‌های جدا شده از لوزه و آدنوئید از لحاظ کمی و کیفی مشابهت‌هایی را پیدا کردند(۱۹). به علاوه در مطالعه‌ای دیگر بروک و همکاران آدنوئید را به عنوان مخزن التهاب لوزه ناشی از *استرپتوکوکوس پیوژنز* معرفی کرده‌اند(۲۰). بررسی ژنوتیپی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*به دلیل نقشی که در تمایز ایزوله‌ها دارد در ردیابی منشاءعفونت ناشی از این باکتری می‌تواند کاربرد بسزایی داشته باشد. تایپینگ بر اساس ژن *spa* یکی از این عوامل متمایز کننده است که دارای ناحیه پلیمورفیسمXبا توالی کوتاه می‌باشد(۲۱).برای مثال درپژوهش‌های مختلف الگوهای متنوعی از این ژن شناساییشده است. این ژن کدکننده پروتئینA می‌باشد که از جمله پروتئین‌های سطحی *استافیلوکوکوس اورئوس* است که علاوه بر این که فاکتور ویرولانسباکتری محسوب می‌شود، جهت تعیین هویت اختصاصی *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز استفاده می گردد(۲۲). تایپینگ ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* روش مناسبی برای اهداف اپیدمیولوژیک می‌باشد. اثبات ارتباطات کلون‌های یک پاتوژن این امکان را می‌دهد که منبع آلودگی(انسان یا محیط) را پیدا کرده، سویه‌های عفونی از سویه‌های غیر عفونی را متمایز نموده و در نهایت عود را از عفونت مجدد تفکیک نماییم(۲۵-۲۳). از آنجایی که احتمالاً باکتری‌های جداسازی شده از لوزه ممکن هست همان‌هایی باشند که در آدنوئید ساکن می‌باشند؛ تعیین ارتباطات ژنوتیپی بین سویه‌های مشابه حایز اهمیت هست، لذا با توجه این که پژوهش‌های محدودی بر روی ویژگی‌های

استافیلوکوس ارئوس جدا شده از آدنوئید کودکان مبتلا به هایپرتروفیآدنوئید صورت گرفته است و با توجه به این که بیوفیلم نقش مهمی در کلونیزاسیون باکتری در آدنوئید دارد و حضور باکتری‌ها در آدنوئید می‌تواند منجر به عوارض متعددی برای کودکان شود و از طرف دیگر از آنجایی که احتمالاً باکتری‌های جداسازی شده از لوزه ممکن هست همان‌هایی باشند که در آدنوئید ساکن می‌باشند، به همین دلیل تعیین ارتباطات ژنوتیپی بین سویه‌های مشابه حایز اهمیت هست. هدف از این مطالعه تعیین و بررسی الگوهای ژنوتیپی جفت ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* از آدنوئید و لوزه کودکان مبتلا به هایپرتوفی ادنوئید با روش Spa typing و بررسی فنوتیپی تولید بیوفیلم و به دنبال آن شناسایی ژن‌های مرتبط با تولید بیوفیلم در*استافیلوکوکوس ارئوس‌های* جدا شده از آدنوئید و لوزه کودکان آدنوئیدکتومی شده بود.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی ـ مقطعی نمونه‌های بالینی(بافت لوزه و آدنوئید) از ۲۰۰ کودک ۱ تا ۱٤ سال مبتلا به هایپرتروفی آدنوئید مراجعه کننده به بخش گوش، حلق و بینی بیمارستان امام سجاد شهر یاسوج در سال۱۳۹۷ـ۱۳۹٦ جمع‌آوری شد. بیماران مورد مطالعه پس از تشخیص بیماری به وسیله متخصص گوش، حلق و بینی کاندیدای آدنوئیدکتومی(برداشتن آدنوئید) و تانسیلوکتومی(برداشتن لوزه) شدند. شرایط ورود بیماران به مطالعه شامل عدم مصرف آنتی‌بیوتیک طی دوهفته قبل از جراحی،عدم ابتلا به سندرم‌های ژنتیکی، اختلالات متابولیک و نواقص مادرزادی بود. در صورتی که هم بافت آدنوئید و لوزه هر بیمار جمع‌آوری نمی‌شد، بیمار از مطالعه خارج می‌شد. شرط خروج عدم درافت هم‌زمان نمونه آدنوئید و لوزه از بیماران تحت شرایط آسپتیک بافت آدنوئید و لوزه هر بیمار بعد از برداشته شدن با عمل جراحی به درون ظرف استریل درپیچ دار منتقل و طی دو ساعت به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی یاسوج ارسال شد. قبل از جمع‌آوری نمونه‌ها از والدین هر یک از بیماران رضایت‌نامه اخذ شد. نمونه‌های بافت آدنوئید و لوزه هر بیمار به طور جداگانه با استفاده از بافت خردکن به صورت هموژن درآمد. برای شناسایی و تعیین هویت *استافیلوکوکوس ارئوس* از محیط‌های کشت اختصاصی و تست‌های بیوشیمیایی مخصوص باکتری استفاده شد.

نمونه‌های بافتی در محیط کشت بلاد آگار به روش کشت چهارتایی کشت داده شدند. پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون، کلنی‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده و

کشت مجدد داده شدند. جهت تشخیص فنوتیپی باکتری از رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست کواگولاز، تست تخمیر قند مانیتول و تست DNase استفاده شد(۲۶). تأیید نهایی باکتری‌ها با استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تکثیر ژن nucA صورت گرفت. در نهایت این مطالعه توصیفی- مقطعی بر روی ۸۶ جفت ایزوله *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از لوزه و آدنوئید کودکان مبتلا به هایپرتورفی آدنوئید انجام شد. پلیت‌ها و لوله‌های کشت میکروبی بعد از پایان پژوهش‌های میکروب‌شناسی به کمک اتو کلاو استریل و به صورت صحیح و بهداشتی پسماندها دفع می‌شدند.

در این روش ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیماران بر روی محیط کشت کنگو رد آگار (Congo Red Agar)کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. ایزوله‌هایی که بر روی این محیط کشت، کلنی سیاه و قهوه‌ای تولید کردند، تولید کننده بیوفیلم و کلنی‌های قرمز به عنوان غیر تولید کننده بیوفیلم در نظر گرفته شدند. برای تهیه محیط کشت کنگو رد آگار ابتدا ۵۳/۵۷ گرم سوکروز؛ ۵۲ گرم از محیط کشت BHI Agar، ۱۶/۰۷ گرم کلرید سدیم و۰/۸۵۷گرم رنگ کنگورد به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و بعد از اتوکلاو و کاهش دمای محیط کشت، گلوکز و آنتی‌بیوتیک و نکومایسین به محیط کشت اضافه گردید(۲۷).

استخراج DNA باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* به روش جوشاندن انجام گرفت، در این روش درون ویال‌های یک و نیم سی‌سی، ۳۰۰ لاندا آب مقطر وارد شد و سه کلونی از باکتری اضافه گردید تا کدورت آن معادل ۰/۵ مک فارلند شود و بعد به درون حمام آب گرم (دمای جوش آب) انتقال داده شد و شناور شد تا باکتری در مجاورت آب جوش به طور کامل تخریب گشته و DNA آن آزاد گردید. سپس در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ده دقیقه قرار سانتریفیوژ شدند. از مایع رویی ویال به میزان ۱۵۰ لاندا که حاوی DNA خالص بود برداشته و در ویال دیگری وارد و ذخیره‌سازی شد. در مرحله بعد برای شناسایی ژن‌های *icaA*، *icaD*، *fnbA* و *clfA* بر اساس روش زمانتار و همکاران از روش مولکولی PCR استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس(آمپلیکون، دانمارک)، ۱ میکرولیتر از هریک از پرایمرها معادل ۲۰ پیکومول در هر واکنش(ماکروژن، کره جنوبی) و ۵ میکرولیتر از DNA مکمل انجام گرفت. شرایط واکنش PCR برای تکثیر و طویل‌سازی قطعات مورد نظر به صورت زیر بود؛ باز شدن اولیه دو رشته در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و به

دنبال آن ۳۵ سیکل شامل باز شدن دو رشته DNA در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو در(دمای ٤۹ درجه سانتی‌گراد برای ژن *icaA* و *icaD*، دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد برای ژن *fnbA* و دمای ٦۰ *درجه سانتی‌گراد برای clfA*) به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تکثیر و طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت مرحله تکثیر و طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی DNA safe stain به مدت یک ساعت در ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شدند(۲۹ و ۲۸). پس از رنگ‌آمیزی ژل آگارز، به منظور مشاهده باندهای ۱۳۵۱ جفت‌بازی برای شناسایی*icaA*، اندازه ۳۸۱ جفت‌بازی برای *icaD* و اندازه ۱۹۱ جفت‌بازی برای *fnbA* و ۱۰۰۰ جفت‌بازی برای *clfA* از تصویر برداری به کمک geldocumentation استفاده شد.

پس از استخراج DNA باکتری به روش جوشاندن، به منظور انجام *spa* typing از پرایمرهای زیر استفاده شد. Spaf; 5′-TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C و Spa R; 5′-CAG CAG TAG TGC CGT TTG CT-3′(۳۰). شرایط PCR برای تکثیر *spa* مشابه تکثیر ژن *clfA* با دمای اتصال پرایمر ٦۱ درجه سانتی‌گراد بود. پس از انجام الکتروفورز و تأیید حضور باندهای مربوط به ژن *spa*، ۲۰ لاندا از محصول جهت تعیین توالی دوطرفه به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. توالی‌های سکانس شده به وسیله نرم‌افزار Chromas آنالیز شدند. سپس ناحیه متغیر ژن در نرم افزار word مشخص گردید و توالی‌های تکراری(معمولاً ۲٤تایی) ناحیه متغیر ژن نیز با کمک نرم‌افزارword شناسایی شدند. در نهایت نوع و ترتیب توالی‌های تکراری در نتیجه مقایسه آنها با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌های مربوط به تعیین توالی ژن *spa* مقایسه شده و *spa* تایپ هر جدایه مشخص گردید.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری توصیفی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

بررسی توانایی تولید بیوفیلم به روش فنوتیپی نشان داد که ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از آدنوئید در ٤۹(۵۷ درصد)مورد توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند، در حالی که در لوزه ٤۰(٤٦/۵ درصد) ایزوله بیوفیلم مثبت بودند. جفت ایزوله جدا شده از آدنوئید و لوزه در در ۳۹ بیمار از لحاظ بیوفیلم فنوتیپی شباهتی نداشتند، به عبارتی جفت ایزوله بیوفیلم مثبت آدنوئید در لوزه بیوفیلم منفی بود و بر عکس، در حالی که در ٤۷ مورد جفت

ایزوله‌های جدا شده از آدنوئید و لوزه از لحاظ تولید بیوفیلم مشابه بودند که ۲۵ جفت ایزوله دارای توانایی تشکیل بیوفیلم و ۲۲ جفت ایزوله قادر به تشکیل بیوفیلم نبودند. بررسی ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم نشان داد که در ۵۸ ایزوله جدا شده از آدنوئید حداقل یکی از ژن‌ها را دارا بودند و در ۲۸ ایزوله هیچ‌کدام از ژن‌های مورد بررسی یافت نشد. بالاترین فراوانی مربوط به *fnbA* بود که در ۵۵ ایزوله شناسایی شد. ژن‌های *icaD*، *clfA* و *icaA* به ترتیب در ۲۷، ۱۷ و ٤ ایزوله شناسایی شدند. جدول ۱ هفت الگوی ژنوتیپی بر اساس حضور ژن‌های مختلف در ایزوله‌های آدنوئید شناسایی شد و غالب‌ترین الگوها ژن *fnbA* به تنهایی و سپس الگوی *icaD-fnbA-clfA* بود(جدول ۲). در ١٦ ایزوله بیوفیلم مثبت جدا شده از آدنوئید هیچ‌کدام از ژن‌ها شناسایی نشد و در ۲۵ ایزوله بیوفیلم منفی حداقل یکی از ژنها مرتبط با تشکیل بیوفیلم شناسایی شد.

فروانی ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم در *استافیلوکوکوس ارئوس*‌های جدا شده از لوزه نشان داد که ٤٤ ایزوله حداقل یکی از ژن‌های مرتبط با بیوفیلم را دارا بودند، به طوری که *fnbA* در ٣٦ ایزوله شناسایی شد و سپس *icaD*، *clfA* و *icaA* به ترتیب در ۱۳، ۱۱ و ۳ ایزوله شناسایی شدند. تعداد ۸ الگوی متفاوت ژنتیکی بر اساس حضور ژن‌های مرتبط با تولید بیوفیلم در ایزوله‌های جدا شده از آدنوئید شناسایی شد که الگوی *fnbA* به تنهایی و الگوی *icaD-fnbA* غالب‌ترین الگوها بودند(جدول ۲).

نتایج حاصل از تایپینگ *استافیلوکوکوس ارئوس* با روش *spa*-typing نشان داد که از مجموع ٨٦ جفت ایزوله *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از آدنوئید و لوزه بیماران، تیپ *spa* در۸۳ ایزوله از جدایه‌های آدنوئید و ۷۳ ایزوله از جدایه‌های لوزه تعیین گردید و تیپ *spa* چند ایزوله باقیمانده مشخص نشد. چهار نوع تیپ *spa* در *استافیلوکوکوس ارئوس*‌های جدا شده از آدنوئید شناسایی شد. تیپ t081 غالب‌ترین تایپ در ۵۸ ایزوله،t701 در ۱۰ ایزوله، t2419 در ۸ ایزوله و t4870 در۷ ایزوله شناسایی شد. در *استافیلوکوکوس ارئوس*‌های جدا شده از لوزه تیپ t081 غالب‌ترین تایپ در ٤٨ ایزوله،t701 در ١٤ ایزوله، t2419 در ٥ ایزوله وt4870 در٦ ایزوله شناسایی شد. در مجموع ۷۳ جفت ایزوله تیپ بندی شدند که ۵۸(۷۹/٤٥ درصد)جفت ایزوله دارای تیپ‌بندی مشابهی بودند، به عبارت دیگر در ۵۸ بیمار، *استافیلوکوکوس ارئوس* جداشده از لوزه و آدنوئید دارای *spa* تایپ مشابهی بودند(جدول ۳).

جدول۱: فراوانی ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم در استافیلوکوکوس ارئوس جدا شده از آدنوئید و لوزه کودکان آدنوئیدوکتومی شده

ردیف	نام ژن	فراوانی در آدنوئید	فراوانی در لوزه
۱	*fnbA*	۵۵	۳۶
۲	*icaD*	۲۷	۱۳
۳	*clfA*	۱۷	۱۱
٤	*icaA*	٤	۳

جدول ۲: فراوانی الگوهای ژنی ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم در *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از آدنوئید و لوزه کودکان آدنوئیدوکتومی شده

ردیف	نام الگو	فراوانی در آدنوئید		فراوانی در لوزه	
		بیوفیلم مثبت	بیوفیلم منفی	بیوفیلم مثبت	بیوفیلم منفی
۱	*icaA-icaD-fnbA-clfA*	۳	۱	–	۱
۲	*icaD-fnbA-clfA*	٦	۷	۱	۱
۳	*fnbA-clfA*	۱	۳	–	٤
٤	*icaD-fnbA*	۲	۸	۲	۳
٥	*icaD-clfA*	–	–	–	۱
٦	*fnbA*	۱۹	٥	۷	۱۷
۷	*icaD*	۱	۱	۲	۲
۸	*clfA*	–	–	۲	۱
۹	*icaA*	۱	–	–	–

جدول۳: فراوانی spa تایپ‌های جدا شده در استافیلوکوکوسارئوس جدا شده از آدنوئید و لوزه کودکان آدنوئیدوکتومی شده

ردیف	نوع و الگوی Spa type	فراوانی در آدنوئید(درصد)	فراوانی در لوزه(درصد)	مشابهت در لوزه و آدنوئید(درصد)
۱	t081	۵۸ (٦۷/٥)	٤۸ (٥٥/۸)	٤٤ (٥۱/۲)
۲	t701	۱۰(۱۱/٦)	۱٤ (۱٦/۳)	٦ (۷)
۳	t2419	۸ (۹/۲)	٥ (٥/۸)	٤ (٤/۷)
٤	t4870	۷ (۸/۲)	٦ (۷)	٤ (٤/۷)
٥	غیر قابل تیپ بندی	۳(۳/٥)	۱۳ (۱٥/۱)	۲۸ (۳۲/٤)
٦	مجموع	۸٦(۱۰۰)	۸٦(۱۰۰)	۸٦(۱۰۰)

بحث

استافیلوکوکوس ارئوس، قادر است با واسطه بیوفیلم به بافت‌های میزبان از جمله آدنوئید، متصل شود(۱۷ و ۱٦). هدف از این مطالعه تعیین فراوانی نسبی بیوفیلم و ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* و هم‌چنین تعیین الگوهای ژنوتیپی جفت ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* از آدنوئید و لوزه کودکان مبتلا به هایپرتوفی آدنوئید با روشSpa typing بود.

بیوفیلم‌ها موجب کاهش فعالیت باکتری و نفوذ آنتی بیوتیک‌ها به داخل آن‌ها خواهد شد. بنابراین، پاکسازی باکتری‌ها به وسیله آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار مشکل خواهد بود. هم‌چنین، باعث فرار باکتری از سیستم ایمنی بدن میزبان خواهد شد. بنابراین بیوفیلم، به طور قابل توجهی بر درمان‌های پزشکی و کنترل عفونت تأثیر می‌گذارد. در مطالعه حاضر تولید بیوفیلم به روش فنوتیپی نشان داد که ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از آدنوئید در ٤٩(٥٧ درصد) مورد توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند، در حالی که در لوزه ٤٠(٤٦/٥ درصد) ایزوله بیوفیلم مثبت بودند. در مطالعه‌ای به وسیله ایمان عینی و همکاران نشان داده شد که تمام(١٠٠درصد) ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از ادنوئید کودکان مبتلا به هایپرتروفی آدنوئید توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند(٣١). در مطالعه‌ای نئوپان و همکاران با بررسی *استافیلوکوکوس ارئوس*‌های جدا شده از نمونه ترشحات زخم نشان دادند که ٦٩/٨ درصد از ایزوله‌ها توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند(٣٢). در مطالعه‌ای دیگر به وسیله گوریشنکار و همکاران بر روی *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از التهاب حلق میزان موارد بیوفیلم مثبت را ٧٧/٨ درصد گزارش کردند(٣٣). گانگادهارا تریونی و همکاران با مطالعه *استافیلوکوکوس ارئوس*‌های جدا شده از منابع مختلف کلینیکی، نشان دادند که ٣٨/٢٩ درصد ایزوله‌ها توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند(٣٤). در مطالعه‌ای دیگر گودرزی و همکاران در ٧٢ درصد از ایزوله‌های ادراری *استافیلوکوکوس ارئوس* موارد بیوفیلم مثبت را شناسایی کرد(٣٥). از نتایج پژوهش‌های فوق مشاهده می‌شود که توانایی تشکیل بیوفیلم به وسیله *استافیلوکوکوس ارئوس* در مناطق مختلف و هم‌چنین نمونه‌های بالینی مختلف متفاوت هست. از آنجا که بیوفیلم نقش مهمی در استقرار باکتری‌ها در محل عفونت دارد، می‌تواند به پیشرفت بیماری و مقاومت آنتی‌بیوتیکی کمک کند. در مطالعه حاضر با توجه به موارد بیوفیلم مثبت اهمیت تشکیل بیوفیلم را تا حدودی در استقرار *استافیلوکوکوس ارئوس* در آدنوئید نشان داده است، هر چند که انتظار می‌رفت تشکیل بیوفیلم به وسیله *استافیلوکوکوس ارئوس* نقش مهم‌تری در کلونیزاسیون آدنوئید یا لوزه داشته باشد. در روش کنگو رد آگار به دلیل این که تمایز رنگ‌ها از هم برای تشخیص سویه‌های بیوفیلم مثبت و منفی *استافیلوکوکوس ارئوس* حایز اهمیت است، به همین دلیل بر نتایج بیوفیلم می‌تواند تا حدودی اثرگذار باشد، لذا استفاده از روش‌های دیگر بررسی تشکیل بیوفیلم از جمله استفاده از میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ برای مشاهده تشکیل بیوفیلم در نمونه‌های بافتی بیماران و روش میکروتیتر پلیت پیشنهاد می‌شود، تا در کنار هم بتوان با دقت بیشتری

میزان موارد مثبت بیوفیلم را شناسایی و ارزیابی کرد.

در تشکیل بیوفیلم به وسیله ایزوله های *استافیلوکووس ارئوس* فاکتورها و ژن‌های متعددی نقش دارند که در این مطالعه ٤ تا از ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم شامل *icaA*،*icaD*، *clfA* و *fnbA* بررسی شدند که میزان فراوانی آنها به ترتیب ٤، ٣١/٤، ١٧ و ٦٤ درصد در آدنوئید و ٣/٥، ١٥/١، ١٢/٨ و ٤١/٩ درصد در لوزه بود. در مطالعه‌ای از ایران گودرزی و همکاران فراوانی ژن‌های *icaD* و *icaA* را به ترتیب ٧٧/٣درصد، ٧٦ درصد در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* به دست آورد و هم‌چنین میزان فراوانی *clfA* و *fnbA* در مطالعه ایشان ٩٤/٧ و ٦٤ درصد گزارش شد(٣٥). پورزال و همکاران با مطالعه *استافیلوکوس ارئوس*های جدا شده از منابع بالینی مختلف در شیراز مشاهده کردند که فراوانی ژن‌های مرتبط با بیوفیلم برای ژن‌های *icaA*، *icaD*، *clfA* و *fnbA*به ترتیب ٥٠، ٦٦/٢، ٧٨/٧ و ٧٣/٧ درصد بودند(٣٦). به علاوه مدنی و همکاران در مطالعه‌ای دیگر، در بین ٣٠ نمونه بالینی فراوانی ژن *clfA* را ٩٣/٣٣ درصد گزارش کردند، در حالی که ژن *fnbA*در هیچ یک از نمونه‌ها شناسایی نشده(٣٧). عظمی و همکاران در فلسطین فراوانی ژن‌های مورد بررسی را در *استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به متی سیلین *clfA*، *fnbA*، *icaA* و *icaD* به ترتیب ٨٠/٢، ٧٨/٢، ١٠٠ و ١٠٠ گزارش کرد(٣٨). ایمان عینی و همکاران با بررسی ژن‌های مرتبط با تولید بیوفیلم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از آدنوئید کوکان مبتلا به هایپرتروفی آدنوئید فراوانی ژن‌های *fnbA*، *icaA* و *icaD* را به ترتیب در ٥/٨، ٧٦/٤ و ٧٦/٤ درصد ایزوله‌ها گزارش کرد(٣١). نتایج به دست آمده از بررسی‌های مختلف نشان می‌دهد که فراوانی هریک از ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم متفاوت است که خود نشان می‌دهد بسته به سویه‌های باکتریایی، منابع کلینیکی مختلف و یا مکان جغرافیایی بر توزیع فراوانی ژن‌ها دخیل هست. در فرآیند تشکیل بیوفیلم دو مرحله اتصال و تجمع اهمیت دارد. مهم‌ترین فاکتورهایی که در اتصال اولیه حایز اهمیت هستند، تحت عنوان مولکول‌های ماتریکس چسبندگی شناسایی کننده اجزای سطحی میکروبی استافیلوکوکی(MSCRAMMs) مثل *FnbA*، *FnbB*، *Cna*، *Fib*، *eno*، *Ebps* و *bap* می‌باشد. به علاوه بیان هم‌زمان هر دو ژن *icaA* و *icaD* که به عنوان بخشی از لوکوس *icaADBC* می‌باشد، در بیان فنوتیپ کپسول پلی ساکاریدی حایز اهمیت است(٤٠ و ٣٩) . نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در بعضی از ایزوله‌های بیوفیلم منفی ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم حضور دارند و به علاوه در بعضی از ایزوله‌های بیوفیلم مثبت ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم شناسایی

نشده‌اند. همان‌طور که اشاره شده است عدم شناسایی ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های بیوفیلم مثبت به علت تنوع ژن‌هایی می‌باشد که با تشکیل بیوفیلم مرتبط هستند از آن جا که در این مطالعه ٤ تا ژن بررسی شده است، احتمالاً سایر ژن‌هایی که مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند می‌توانند در تشکیل بیوفیلم نقش داشته باشند.از طرف دیگر وجود ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های بیوفیلم منفی می‌توانند به علت استفاده از یک روش در تشخیص فنوتیپی بیوفیلم در این مطالعه باشد و در صورتی‌که از روش‌های مکمل در کنار هم استفاده شود، موارد مثبت فنوتیپی بیشتری از ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* شناسایی خواهد شد.

در مطالعه حاضر ٤ نوع تیپ *spa* در *استافیلوکوکوس ارئوس* شامل تیپ t081 غالب‌ترین تایپ در ٦٧/٥درصد،t701در ١١/٦ درصد، t2419 در ٩/٣ درصد و t4870 در٨/٢ درصد از ایزوله‌های آدنوئید شناسایی شد. ایمان عینی و همکاران ٢١ نوع spa تایپ را در *استافیلوکوکوس ارئوس*‌های جدا شده از آدنوئید شناسایی کردند که t7685، t230، t325 و t1149 به ترتیب در ١١/٥، ٨، ٨ و ٨ درصد شناسایی شدند(٣١)و هیچ‌کدام از تایپ‌های شناسایی شده در مطالعه نامبرده مشابه مطالعه حاضر نبود و تنوع بسیار بالاتری از مطالعه حاضر داشت. لی و همکاران با مطالعه ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* بیش از ٧٩ تیپ مختلف *spa* را در ایزوله‌های خود شناسایی کردند و هیچ‌کدام از *spa* تایپ‌های شناسایی شده مشابه مطالعه حاضر نبودند(٤١). سینق و همکاران ٣٩ تیپ *spa* را در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* خود شناسایی کردند و هیچ‌کدام از تایپ‌ها شبیه مطالعه حاضر نبودند(٤٢). دربان ساروخلیل و همکاران با مطالعه تایپ‌بندی *spa* در *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از منابع کلینیکی بیمارستان ١٩ تیپ مختلف *spa* را شناسایی کرد که مشابه مطالعهt701 به میزان ١٦ درصد شناسایی شد(٤٣). در مطالعه رمضان‌زاده و همکاران بیش از ٢٠ نوع *spa* تایپ شناسایی شد و t701 در ٣ مورد یافت شد(٤٤). با مقایسه نتایج حاصل از*spa* تایپینگ مطالعه حاضر و سایر پژوهش‌های مشاهده می‌شود که تنوع *spa* تایپ‌ها در مطالعه حاضر نسبت به سایر پژوهش‌های دیگر خیلی پایین‌تر هست که احتمالاً نشان دهنده این هست که *spa* تایپ‌های محدودی در این منطقه در عفونت لوزه و آدنوئید نقش دارند. اثبات ارتباطات کلون‌های یک پاتوژن این امکان را می‌دهد که منبع عفونت شناسایی شود و سویه‌های عفونی از سویه‌های غیر عفونی تمایز داده شود و در نهایت عود از عفونت مجدد تفکیک شود. از آن جایی که احتمالاً باکتری‌های جداسازی شده از آدنوئید ممکن

هست همان‌هایی باشند که در لوزه ساکن هستند، در این مطالعه *spa* تایپ‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از آدنوئید و لوزه بیماران بررسی و مقایسه شدند و نتایج نشان داد که در ۷۹/۴۵ درصد بیماران، spa تایپ مشابهی در *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از لوزه و آدنوئید شناسایی شد و نشان دهنده این است که *استافیلوکوکوس ارئوس*‌هایی که در لوزه کلونیزه می‌شوند، به عنوان منبع عفونت برای آدنوئید عمل می‌کنند و به علت ساختار آناتومیکل و مجاورت با هم، باکتری‌ها از لوزه به آدنوئید منتقل می‌شوند و به عبارت دیگر لوزه می‌تواند به عنوان منبع عفونت برای آدنوئید عمل کند. از آنجا که روش‌های تایپینگ دیگری برای ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* مطرح هستند، استفاده از روش‌های دیگر در کنار روش spa-typing می‌تواند ارتباط بین جفت ایزوله‌های آدنوئید و لوزه را بهتر نمایان سازد و در شناسایی منبع عفونت کمک کننده باشد. از محدودیت‌های مطالعه حاضر استفاده از یک روش فنوتیپی برای شناسایی موارد بیوفیلم مثبت و همچنین استفاده از یک روش تایپینگ برای ژنوتایپینگ ایزوله‌های استافیلوکوکوس ارئوس بود که هر چند برای مطالعه حاضر کافی به نظر می‌رسند، ولی استفاده از سایر روش‌ها می‌تواند به نتیجه‌گیری صحیح‌تر مطالعه کمک کند. از طرف دیگر به علت تنوع ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس ارئوس*، شناسایی سایر ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم می‌تواند در زمینه ایزوله‌های بیوفیلم فنوتیپی مثبت، ولی فاقد ژن مرتبط با تشکیل بیوفیلم، کمک شایانی نماید، لذا پیشنهاد می شود در مطالعات آتی برای تقویت پژوهش‌های مشابه از دو روش تشخیصی فنوتیپی بیوفیلم و همچنین بررسی تعداد بیشتری از ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم استفاده کرد که تا حد زیادی محدویت‌های پژوهش‌های مشابه را کاهش دهد.

نتیجه‌گیری

ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جداشده از لوزه و آدنوئید بیماران مبتلا به هایپرتروفی آدنوئید در مطالعه حاضر فراوانی نسبی متوسطی در تولید بیوفیلم داشتند که اهمیت نسبی تشکیل بیوفیلم را در استقرار *استافیلوکوکوس ارئوس* در لوزه و آدنوئید بیماران نشان می‌دهد. همچنین نقش ژن *fnbA* در مقایسه با سایر ژن‌های مورد مطالعه در تشکیل بیوفیلم بیشتر از سایرین بود. مشابهت بالای *spa* تایپ‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از آدنوئید و لوزه بیماران نشان دهنده این است که *استافیلوکوکوس ارئوس*‌هایی که در لوزه کلونیزه می‌شوند، به عنوان منبع عفونت برای آدنوئید عمل می‌کنند به عبارت دیگر باکتری‌ها از لوزه‌ها وارد ساختار آدنوئید می‌شوند.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته ازپایان‌نامه رشته پزشکی با کد اخلاق IR.YUMS.REC.1398.056 دانشگاه علوم پزشکی یاسوج می‌باشد و با همکاری این دانشگاه انجام شده است. نویسندگان برخود لازم می‌دانند از مسئولین محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج تقدیر و تشکر نمایند.

REFERENCES

1.Byrd AL, Deming C, Cassidy SKB, Harrison OJ, Ng W-I, Conlan S, et al. Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis strain diversity underlying pediatric atopic dermatitis. American association for the advancement of science. Sci Transl Med 2017; 9(397): eaal4651.
2.Rajeshwary A, Rai S, Somayaji G, Pai V. Bacteriology of symptomatic adenoids in children.
N Am J Med Sci 2013;5(2):113-8.
3.Korona-Glowniak I, Niedzielski A, Kosikowska U, Grzegorczyk A, Malm A. Nasopharyngeal vs. adenoid cultures in children undergoing adenoidectomy: prevalence of bacterial pathogens, their interactions and risk factors. Epidemiology & Infection 2015;143(4):821-30.
4.Johnston JJ, Douglas R. Adenotonsillar microbiome: an update. Postgrad Med J 2018;94(1113):398-403.
5.Geng W, Qi Y, Li W, McConville TH, Hill-Ricciuti A, Grohs EC, et al. Epidemiology of Staphylococcus aureus in neonates on admission to a Chinese neonatal intensive care unit. PLoS One 2020; 15(2):e0211845
6.Hulterström AK, Sellin M, Monsen T, Widerström M, Gurram BK, Berggren D. Bacterial flora and the epidemiology of staphylococcus aureus in the nose among patients with symptomatic nasal septal perforations. Acta Otolaryngol 2016;136(6):620-5.
7.Mehraj J, Witte W, Akmatov MK, Layer F, Werner G, Krause Gr. Epidemiology of Staphylococcus aureus nasal carriage patterns in the community. Curr Top Microbiol Immunol 2016;398:55-87.
8.Sabz G, Moradi S, Sharifi A, Naghmachi M, Taheripour Sisakht M**,** et al. Identification and detection of pathogenic bacteria in adenoid tissue of adenoidectomized children: emergence of staphylococcus aureus as the most prevalent pathogen. Jundishapur J Microbiol 2020; 13(1); e95445.
9.Khatoon Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah TF, Alarcon EI. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. Heliyon 2018;4(12):e01067.
10.Periasamy S, Joo HS, Duong AC, Bach THL, Tan VY, Chatterjee SS, et al. How Staphylococcus aureus biofilms develop their characteristic structure.Proc Natl Acad Sci USA 2012;109(4):1281-6.
11.Fleming D, Rumbaugh KP. Approaches to dispersing medical biofilms. Microorganisms 2017; 5(2):15.
12.Gonzalez-Delgado LS, Walters-Morgan H, Salamaga BO, Robertson AJ, Hounslow AM, Jagielska Eb, et al. Two-site recognition of Staphylococcus aureus peptidoglycan by lysostaphin SH3b.Nat Chem Biol 2020;16(1):24-30.
13.Monteiro JoM, Covas Ga, Rausch D, Filipe SrR, Schneider T, Sahl HG, et al. The pentaglycine bridges of Staphylococcus aureus peptidoglycan are essential for cell integrity. Sci Rep 2019;9(1):5010.
14.Mistretta Nl, Brossaud M, Telles F, Sanchez V, Talaga P, Rokbi B. Glycosylation of Staphylococcus aureus cell wall teichoic acid is influenced by environmental conditions.
Sci Rep 2019;9(1):3212.
15.Keinhoerster D, George SE, Weidenmaier C, Wolz C. Function and regulation of Staphylococcus aureus wall teichoic acids and capsular polysaccharides. Int J Med Microbiol 2019;309(6):151333.
16.Bertelli AM, Delpino MaV, Lattar S, Giai C, Llana MnN, Sanjuan N, et al. Staphylococcus aureus protein A enhances osteoclastogenesis via TNFR1 and EGFR signaling. Biochim Biophys Acta. 2016 ; 1862(10): 1975–1983
17.Gomez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, et al. Staphylococcus aureus protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. Biochim Biophys Acta 2016;1862(10):1975-83.
18.Alasil SM, Omar R, Ismail S, Yusof MY, Dhabaan GN, Abdulla MA. Evidence of bacterial biofilms among infected and hypertrophied tonsils in correlation with the microbiology, histopathology, and clinical symptoms of tonsillar diseases. Int J Otolaryngol 2013;2013:408238.
19.Taylan I, Ozcan I, Mumcuoglu I, Baran I, Ozcan KM, Akdogan O, et al. Comparison of the surface and core bacteria in tonsillar and adenoid tissue with Beta-lactamase production.Indian J Otolaryngol Head Neck Surg 2011;63(3):223-8.
20.Brook I, Shah K. Bacteriology of adenoids and tonsils in children with recurrent adenotonsillitis. Ann Otol Rhinol Laryngol 2001;110(9):844-8.
21.Wang X. Spa Typing of Staphylococcus aureus Isolates. Methods Mol Biol 2020;2069:89-94.

22.Mathema B, Mediavilla J, Kreiswirth BN. Sequence analysis of the variable number tandem repeat in Staphylococcus aureus protein A gene. Methods Mol Biol 2008;431:285-305.
23.Strommenger B, Braulke C, Heuck D, Schmidt C, Pasemann B, Nubel U, et al. spa typing of Staphylococcus aureus as a frontline tool in epidemiological typing. J Clin Microbiol2008;46(2):574-81.
24.Matussek A, Taipalensuu J, Einemo M, Tiefenthal M, Lofgren S. Transmission of Staphylococcus aureus from maternity unit staff members to newborns disclosed through spa typing. Am J Infect Control 2007;35(2):122-5.
25.Mellmann A, Weniger T, Berssenbruچˆgge C, Keckevoet U, Friedrich AW, Harmsen D, et al. Characterization of clonal relatedness among the natural population of Staphylococcus aureus strains by using spa sequence typing and the BURP (based upon repeat patterns) algorithm. J Clin Microbiol 2008;46(8):2805-8.
26. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology. 3rd ed Elsevier Health Sciences; 2014. 367-378.
27.Kaiser TsDL, Pereira EM, Dos Santos KtRN, Maciel ELN, Schuenck RP, Nunes APF. Modification of the congo red agar method to detect biofilm production by Staphylococcus epidermidis. Diagn Microbiol Infect Dis 2013;75(3):235-9.
28.Darwish SF, Asfour HAE. Investigation of biofilm forming ability in Staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. ScientificWorldJournal 2013;2013:378492.
29.Zmantar T, Chaieb K, Makni Hl, Miladi H, Abdallah FB, Mahdouani K, et al. Detection by PCR of adhesins genes and slime production in clinical Staphylococcus aureus. J Basic Microbiol 2008;48(4):308-14.
30.Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Claus H, Turnwald D, et al. Typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. J Clin Microbiol 2003;41(12):5442-8.
31.Emaneini M, Khoramrooz SS, Taherikalani M, Jabalameli F, Aligholi M. Molecular characterization of Staphylococcus aureus isolated from children with adenoid hypertrophy: Emergence of new spa types t7685 and t7692. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2011;75(11):1446-9.
32.Neopane P, Nepal HP, Shrestha R, Uehara O, Abiko Y. In vitro biofilm formation by Staphylococcus aureus isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. Int J Gen Med 2018;11:25-32.
33.Gowrishankar S, Kamaladevi A, Balamurugan K, Pandian SK. In vitro and in vivo biofilm characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from patients associated with pharyngitis infection. Biomed Res Int 2016; Article ID 1289157.
34.Triveni AG, Kumar MS, Manjunath C, Shivannavar CT, Gaddad SM. Biofilm formation by clinically isolated Staphylococcus aureus from India.J Infect Dev Ctries 2018;12(12):1062-6.
35.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. J Infect Dev Ctries 2019;13(9):777-85.
36.Pourzal F, Haghkhah M. Prevalence of Biofilm Associated Genes in Different Isolates of Staphylococcus aureus. J Med Bacteriol 2020;9(1-2):9-15.
37.Madani SB, madani K. The phenotypic and genotypic study of Staphylococcus aureus biofilm genes isolated from clinical and food cases by microtiterpolytte and Multiplex PCR. Research in Medicine 2018; 42(1):52-8.
38.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):578.
39.Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of icaA and icaD genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections.
J Clin Microbiol 2001;39(6):2151-6.
40.Atshan SS, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Lung LTT, Hamat RA, Karunanidhi A, et al. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of Staphylococcus aureus. J Biomed Biotechnol 2012; Article ID 976972.
41.Li X, Huang T, Xu K, Li C, Li Y. Molecular characteristics and virulence gene profiles of Staphylococcus aureus isolates in Hainan, China. BMC Infect Dis 2019;19(1):873.

42.Singh G, Broor S, Agarwal P. Molecular characterisation of Staphylococcus aureus using spa typing as a diagnostic tool in Haryana, India. Indian J Med Microbiol 2018;36(1):26-31.
43.Darban-Sarokhalil D, Khoramrooz SS, Marashifard M, Hosseini SAAM, Parhizgari N, Yazdanpanah M, et al. Molecular characterization of Staphylococcus aureus isolates from southwest of Iran using spa and SCCmec typing methods. Microb Pathog 2016;98:88-92.
44.RamazanzadehR, DarehshiriMH,MirzaiiM. Staphylococcal protein A(spa) typing of Staphylococcus aureus isolates causing nosocomial infections. Chron Dis J 2018; 6(4): 225-9.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Determination of Relative Abundance of Biofilm, Genes Associated with its Formation and Determination of Genetic Diversity(spa-type) of *Staphylococcus aureus* Isolated from Adenoids and Tonsils of Children with Adenoid Hypertrophy

Moradi S[1], Sabz GH[2], Khoramrooz SN[1], Mirzaii N[1], Cheraghzadeh SR[2], Ghatee MA[3], Salahi M[1], Sharifi A[3], Mazlumirad F[1], Naghmachi M[3], Mirzaii M[4], Milani S[1], Khoramrooz SS[3*]

[1]Student Research Committee, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran,[2]Department of Otolaryngology, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran,[3]Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [4]Faculty of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran

Received: 20 Aug 2021 Accepted: 19 Oct 2021

Abstract:

Background & aim: Adenoid hypertrophy is one of the childhood complications in which bacteria are involved in its etiology. The aim of the present study was to determine the relative abundance of biofilms and genes associated with biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates and also to determine the genotypic patterns of *S. aureus* isolates from adenoids and tonsils of children with adenoid hypertrophy by Spa typing method.

Methods: The present cross-sectional study was conducted on 86 pair isolates of *S. aureus* collected from adenoid and tonsil of children with adenoid hypertrophy. Phenotypic method used for assessing of biofilm production in *S. aureus* isolates and the presence of ica*A,* ica*D,* fnb*A* and clf*A* genes evaluated using polymerase chain reaction method. The spa typing method was apllied for typing of isolated. Data were analyzed using descriptive statistics method and SPSS software.

Results: *S. aureus* isolated from adenoids and tonsils were positive in 49 (57%) and 40 (46.5%) biofilms, respectively. In 47 cases, pairs of isolates from the adenoids and tonsils were similar in terms of biofilm production. In the present study, 4 types of spa types were identified in *S. aureus* including t081 type, the most dominant type in 67.5%, t701 in 11.6%, t2419 in 9.3% and t4870 in 8.2% of adenoid isolates. In total, 79.45% of adenoid and tonsil isolates had similar typing. highest frequency of genes was related to fnb*A*, which was detected in adenoids in 64% and in tonsils in 41.9% of isolates.

Conclusion: Due to the relative frequency of biofilm formation, biofilm is of moderate importance in the establishment of *Staphylococcus aureus* in the tonsils and adenoids of patients. Moreover, the role of fnb*A* gene in biofilm formation was higher than other studied genes. High spa similarity *Staphylococcus aureus* isolates isolated from the adenoids and tonsils indicate the initial colonization of bacteria in the tonsils and then act as a source of infection for the adenoids

Keywords: *S. aureus*, Biofilm, spa typing, Adenoid

[*]**Corresponding author: Khoramrooz SS,** Cellular and Molecular Research Center,Yasuj University of Medical Sciences, Next to Imam Sajjad Hospital, Shahid Ghorbanali Jalil Blvd, Yasuj, Iran.
Email : Khoramrooz@gmail.com

Please cite this article as follows:
Moradi S, Sabz GH, Khoramrooz SN, Mirzaii N, Cheraghzadeh SR, Ghatee MA, Salahi M, Sharifi A, Mazlumirad F, Naghmachi M, Mirzaii M, Milani S, Khoramrooz SS. Determination of Relative Abundance of Biofilm, Genes Associated with its Formation and Determination of Genetic Diversity(spa-type) of *Staphylococcus aureus* Isolated from Adenoids and Tonsils of Children with Adenoid Hypertrophy. Armaghane-danesh 2021; 26(4): 494-510.