ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۵، شماره٤، مهر و آبان ۱۳۹۹(شماره پی در پی ۱٤۱)

بررسی قدرت تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت در باکتری اشرشیاکلی یوروپاتوژن جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری همراه با سنگ سیستم ادراری

مهدی بخشی[۱]، هوشنگ جمالی[۲*]

[۱] گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران، [۲]گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی‌جهرم، جهرم، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۸/۰۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۱٤

چکیده

زمینه و هدف: عفونت دستگاه ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های بیمارستانی است که از کلونیزه شدن *اشرشیا کلی* یوروپاتوژن در اپیتلیوم مخاطی میزبان و تشکیل بیوفیلم میکروبی ناشی می‌شود و به بافت میزبان آسیب می‌رساند. هدف از این مطالعه تعیین و بررسی قدرت تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت در باکتری اشرشیاکلی یوروپاتوژن جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری همراه با سنگ سیستم ادراری بود.

روش بررسی: این پژوهش یک مطالعه نیمه‌تجربی با بهره‌گیری از طرح پیش‌آزمون- پس‌آزمون می‌باشد که در سال ۱۳۹۴ انجام شد، تعداد ۳۸۰ بیمار دارای کشت ادرار مثبت با باکتری *اشرشیا کلی* مورد بررسی قرار گرفت. از این تعداد بیماران ۳۴ نفر به صورت همزمان دارای سنگ سیستم ادراری و عفونت ادراری با *اشرشیا کلی* بودند. این سنگ‌ها با رعایت شرایط استریل جهت کشت به آزمایشگاه ارسال شدند. برای حفظ و نگهداری طولانی مدت باکتری جهت جمع‌آوری و انجام تست‌های دیگر به نحوی که خود باکتری آسیب نبیند، در حالت ذخیره گلیسرول(Glycerol Stock) نگهداری شدند. برای بررسی میزان قدرت تشکیل بیوفیلم این باکتری با روش میکروتیترپلیت بررسی شدند.

نتایج: نتایج نشان دادند که مجموع ۳۴ نمونه سنگ مورد بررسی به کمک روش های متداول حاوی *اشریشیا کلی یوروپاتوژن* بودند که این میکروارگانیسم از نظرمیزان تشکیل بیوفیلم ۱۸ درصد قدرت بسیار کم، ۲۰ درصد قدرت متوسط و ۵۹ درصد دارای قدرت بسیار بالا نشان داد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه نشان داده شد که وجود همزمان عفونت به همراه سنگ‌های ادراری به عنوان یک سطح و بستر مناسب برای باکتری *اشریشیا کلی یوروپاتوژن* و در نتیجه تشکیل بیوفیلم این باکتری بر سطح سنگ، باعث استقرار بیشتر عفونت دستگاه ادراری و همچنین ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های ایجاد کننده عفونت دستگاه ادراری شود.

واژه‌های کلیدی: *عفونت‌های دستگاه ادراری، اشریشیا کلی یوروپاتوژن، بیوفیلم*

[*] **نویسنده مسول: هوشنگ جمالی، جهرم**، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی

Email: h.jamali1970@gmail.com

مقدمه

کسترتون یکی از پدران بنیان‌گذار پژوهش بیوفیلم است که بیوفیلم را به عنوان جامعه ساخته شده از سلول‌های باکتریایی محصور شده در یک ماتریکس پلی‌مری و چسبناک به سطوح زنده و غیر زنده شرح می‌دهد(۱). این حالت رشد بیوفیلم می‌تواند یک سبک زندگی خاص در مقایسه با شیوه غیر متصل (Planctonic)به نظر برسد و بیوفیلم شکل بگیرد(۲). این بررسی بر روی تشکیل بیوفیلم *اشریشیاکلی* یوروپاتوژن(UPEC) تمرکز می‌کند، این باکتری به طور معمول در چند ساعت پس از تولد در دستگاه گوارش نوزادان انسان کلونیزه می‌شود و با میزبان خودش برای ده‌ها سال به طور همزیست زندگی می‌کند. این ارگانیسم به یک مدل برای مطالعه بسیاری از فرآیندهای سلولی تبدیل شده است. بنابراین، به طور معمول از منشأ مدفوعی *اشریشیا کلی* به عنوان شاخص آلودگی آب با مدفوع استفاده می‌شود و به وسیله دستیابی به فاکتورهای بیماری‌زا ، چندین سویه بسیار سازگار به عنوان پاتوژن‌های بدنام یک طیف وسیعی از بیماری‌ها را ایجاد می‌کند و خطر قابل توجهی را برای سلامت انسان در سر تا سر جهان در بر خواهد داشت(۳).

یک طرح معمول برای تشکیل بیوفیلم باکتریایی متمایز و بالغ مطرح شده است. در این مقاله بیوفیلم از طریق حداقل پنج مرحله توسعه می‌یابد؛ ۱ـ اتصال برگشت‌پذیر اولیه از باکتری‌های پلانکتونی نزدیک به یک سطح جامد به وسیله جریان سیال یا از طریق حرکت که بر دافعه نیروهای بین سلول و سطح غلبه دارد، این سطح جامد یک سطح مناسب است به این معنی که سطح مورد نظر به وسیله املاح مختلف تغییر یافته است. ۲ـ گذر از حالت اتصال برگشت‌پذیر به اتصال غیرقابل برگشت به وسیله پلیمرهای خارج سلولی، به وسیله باکتری و یا ادهسین‌های خاص مثل پیلی یل فیمبریه. ۳ــ توسعه زود هنگام ساختار بیوفیلم. ۴ـ توسعه میکروکلنی‌ها به یک بیوفیلم بالغ، همچنین در این مرحله مواد پلی مری خارج سلولی که به عنوان ماتریکس چسبنده به خدمت گرفته شد ه است، همچنان در محیط تولید می‌شود. ۵ ـ پراکنده کردن سلول‌ها از بیوفیلم به محیط اطراف و بازگشتن به حالت غیر متصل(۴).

معماری پیچیده بیوفیلم‌ها، برای باکتری‌های محصور شده در این ماتریکس یک مکانیسم دفاعی را در برابر عوامل ضدمیکروبی فراهم می‌کند. در کاتترهای ادراری تشکیل بیوفیلم تقریباً اجتناب ناپذیر است(۵). وارد کردن یک کاتتر ممکن است یوروپاتوژن‌ها را به داخل مثانه تلقیح کند که می‌تواند از حالب بالا رفته و کلیه‌ها را عفونی کند. در حالی که باکتری‌های پلانکتونی می‌توانند با آنتی‌بیوتیک‌های رایج ریشه کن شود، باکتری‌های متصل در بیوفیلم‌ها بیشتر به بیوسایدها مقاوم هستند(۴). دانشمندان نشان داده‌اند که بیوفیلم‌ها می‌توانند صدها تا هزاران بار مقاوم تر از باکتری‌های غیر متصل باشند. این به این

معنی است که حداقل غلظت مهاری از آنتی‌بیوتیک‌های مورد نیاز برای از بین بردن بیوفیلم‌ها می‌تواند بسیار سمی باشد، اگر آن به بیمار تجویز شده باشد. بنابراین بیوفیلم‌ها معمولاً در کاتتر می‌توانند تا زمانی که دستگاه حذف شود و با یک دستگاه جدید جایگزین گردد، باقی بمانند(۴).

تئوری‌های مختلفی وجود دارد که مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را در بیوفیلم توضیح می‌دهد(۵). ماتریکس غنی از پلی‌ساکارید یا گلیکوکالیکس احاطه کننده باکتری‌ها می‌تواند به عنوان یک فیلتر مولکولی عمل کند به طوری که از نفوذ آنتی‌بیوتیک به داخل بیوفیلم جلوگیری می‌کند(۶). پژوهشگران هم‌چنین پیشنهاد کرده‌اند که مقاومت باکتریایی در بیوفیلم‌ها می‌تواند به وسیله یک واکنش تأخیری و نفوذ آنتی‌بیوتیک در ماتریکس بیوفیلم توضیح داده شود، اگر آنتی‌بیوتیک در بیوفیلم غیر فعال شود، نفوذ آن می‌تواند به تعویق افتاده باشد(۶).

در مطالعه‌ای، مقاومت به سیپروفلوکسازین در ۲۳/۹ درصد از نمونه‌هایUPEC پیدا شده است. در این مطالعه ، مقاومت به سیپروفلوکسازین در UPEC درمان شده در عفونت‌های ادراری پیچیده ۱۹/۵ درصد بیشتر از UPECهای بدون عارضه است(۸/۵ درصد). در پژوهش‌های انجام شده، بیماران مسن تر سطوح بالایی از مقاومت را به فلوروکینولون نشان می‌دهند. نیتروفورانتوئین یک فعالیت خوب را در برابر نمونه‌های جدا شده UPEC با تنها ۳/۸ درصد جدا شده‌های مقاومت نشان داده است. اگرچه، مقدار دوز تجویزی دارو و پتانسیل سمیت ریوی سودمندی آن را کاهش می‌دهد. فسفومایسین به عنوان فعال‌ترین آنتی‌بیوتیک خوراکی در مقابل ایزوله‌های UPEC باقی مانده است. مقاومت به این دارو ۱/۷ درصد در پژوهش‌های چند مرکز منتشر شده است. این ترکیب معمولاً فعالیت خود را در برابر تولید کننده‌ها(ESBL) باکتری‌های مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز با طیف وسیع حفظ می‌کند(۷).

تشکیل بیوفیلم ممکن است به عنوان یک عامل تعیین کننده بیماری‌زای دیگر که اجازه می‌دهد سویه‌های باکتری برای مدت طولانی‌تر در دستگاه ادراری ـ تناسلی باقی بمانند و نفوذ کنند، در نظر گرفته شود. بیوفیلم امتیازات مختلفی را به باکتری می‌بخشد، از جمله کسب تحمل به آنتی‌بیوتیک، بیان چندین فاکتور ویرولان، افزایش مقاومت در برابر فاگوسیتوز و سایر مکانیسم‌های دفاعی میزبان(۸)، تعیین و بررسی قدرت تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت در باکتری اشرشیاکلی یوروپاتوژن جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری همراه با سنگ سیستم ادراری بود.

روش بررسی

این پژوهش یک مطالعه نیمه تجربی با بهره‌گیری از طرح پیش‌آزمون- پس‌آزمون می‌باشد که در سال ۱۳۹۴ انجام شد، تعداد ۳۸۰ بیمار دارای کشت

ادراری حاوی باکتری *اشرشیا کلی* بودند مورد بررسی قرار گرفت. از این تعداد بیماران ۳۴ نفر به صورت همزمان دارای سنگ سیستم ادراری و عفونت ادراری با *اشرشیا کلی* بودند. قبلاً از این افراد کشت ادراری گرفته شده بود که دارای عفونت ادراری با *اشرشیا کلی* و همزمان دارای سنگ سیستم ادراری بودند. سپس این سنگها با رعایت شرایط استریل درون لوله‌های فالکون درپوشدار و حاوی نرمال‌سالین استریل جهت آنالیز کشت میکروبی سنگهای ادراری به آزمایشگاه ارسال شدند. هر کدام از نمونه ها به طور مجزا ابتدا به وسیله نرمال سالین استریل ۵ مرتبه شستشو داده شد تا از وجود آلودگی‌های اضافی پاک گردد. سپس این سنگها درون هاون استریل در زیر هود و با رعایت کامل شرایط استریل در مجاورت شعله به صورت پودر تبدیل شدند. هر کدام از این سنگ‌های ساییده شده به طور مجزا درون ۵ میلی‌لیتر نرمال سالین استریل درون لوله فالکون استریل درپوش دار به وسیله ورتکس به هم زده شدند و به یک سوسپانسیون همگن تبدیل شد. سپس از این سوسپانسیون به وسیله لوپ استاندارد بر روی محیط کشت EMB آگار و سپس بر روی کشت نوترینت آگار کشت داده شدند و با تستهای بیوشیمیایی متداول شامل بررسی استفاده از سیترات به عنوان تنها منبع کربن با استفاده از محیط سیمون سیترات آگار(SCA)، بررسی تولیدCO_2 در محیط سه قندی حاوی آهن(TSI)، بررسی حرکت، اندول و سولفور در محیط SIM، بررسی کلنی با جلای فلزی بر روی محیط ائوزین متیلن بلو(EMB) حضور باکتری *اشرشیا کلی یوروپاتوژن* تأیید شد. پس از انجام این کار مشخص شد که ۳۴ نمونه حاوی باکتری *اشرشیا کلی یوروپاتوژن* می‌باشد. سویه‌های تأیید شده اشریشیاکلی با روش گلیسرول استوک برای ذخیره سازی(در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد، تا در آزمایش‌های دیگر مورد استفاده قرار گیرند. برای حفظ و نگهداری باکتری در مدت‌های طولانی باید کشت آن را به نحوی منجمد کنیم تا خود باکتری آسیبی نبیند تا بتوانیم در زمان‌های بعدی از آن استفاده کنیم. برای این منظور از محیط کشت آبگوشتی Broth Brain-Heart Infusion (BHI) دارای ۱۸ درصد گلیسرول استفاده می‌کنیم. در اینجا ما می‌خواهیم در یک ویال ۵۰ میلی‌لیتری محیط را درست کنیم، بنابراین نیاز به ٤٠ میلی‌لیتر محیط داریم، تا با افزودن گلیسرول مقدار آن از ۵۰ میلی‌لیتر تجاوز نکند. با توجه به توضیح نوشته شده روی استوک محیط BHI، برای ساخت ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط، نیاز به ۳۷ گرم از پودر استوک داریم، بنابراین برای تهیهٔ ٤٠ میلی‌لیتر محیط ۱/٤۸ گرم پودر را داخل ویال ریخته و ٤٠ میلی‌لیتر آب به آن اضافه نموده و درب ویال را محکم می‌کنیم. بعد از حل کردن کامل پودر داخل آب مقطر، گلیسرول را به آن اضافه می‌کنیم،گلیسرول ما باید ۱۸ در ۱۰۰ باشد، یعنی برای یک محیط ٤٠ میلی‌لیتری دارای ۱۸ درصد گلیسرول، ۷/۲ میلی‌لیتر

گلیسرول نیاز داریم. پس از ساخت محیط و محکم کردن درب ویال، آن را اتوکلاو می‌کنیم. با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم لام‌ها رنگ‌آمیزی شد. با انتقال لام‌ها به زیر میکروسکوپ و مشاهده با عدسی ۱۰۰، باسیل‌های گرم منفی به رنگ صورتی یا قرمز روشن مشاهده شد. در این تحقیق از آزمایش اتصال سلول‌های باکتری به هیدروکربن اکتان به عنوان یک سطح مورد اتصال(MATH) جهت سنجش هیدروفوبیسیتی استفاده شد.

جهت انجام آزمایش از بافر فسفات(PBS) با ترتیب زیر تهیه شد؛ کلریدسدیم ۸ گرم، پتاسیم مونوفسفات ۲/۰ گرم، دی سدیم هیدروژن فسفات ۹/۲ گرم، کلرید پتاسیم ۲/۰ گرم، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر و PH ۱/۷ ـ ۲/۷ بررسی تشکیل بیوفیلم UPEC با روش میکروتیتر پلیت با استفاده از روش اتصال به کریستال ویوله(Crystal Violet; CV) انجام شد(۹).

برای بررسی تشکیل بیوفیلم این باکتری، ابتدا یک لوپ پر از کلنی باکتری را به یک لوله حاوی ۵ میلی‌لیتر لوریا برتانی(LB) تلقیح و این لوله به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. بعد از گذشت این مدت و فعال شدن باکتری ها، ۱میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری برداشته و به لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط استریل LB تلقیح شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محیط ۱۰ میلی‌لیتری برداشته و داخل چاهک‌های میکروتیتر پلیت ریخته شد. در چاهک شاهد فقط محیط کشت استریل LB قرار داده شد. جنس میکروتیترپلیت‌ها از پلی‌استیرن می‌باشد و هر کدام دارای ۸ ردیف و ۱۲ ستون می‌باشد. بعد از تلقیح درب پلیت گذاشته شد و گرماگذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت.

بعد از گذشت این مدت، محتوی داخل چاهک‌ها خالی شد و شستشوی چاهک‌ها ۳ بار با سرم فیزیولوژی استریل انجام شد. پلیت‌ها به شدت تکان داده شدند تا سلول‌های غیر متصل حذف شوند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد به چاهک‌ها اضافه گردید تا سلول‌ها تثبیت گردند. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه، محتوبات چاهک‌ها تخلیه شد و در دمای آزمایشگاه سطح پلیت‌ها خشک گردید. سپس هر چاهک را با ۲۰۰ میکرولیتر از کریستال ویوله ۲ درصد(CV) به مدت ۵ دقیقه رنگ شد. بعد از ۵ دقیقه، چاهک‌ها با آب شهری به آرامی شسته شد و با ۲۰۰ میکرولیتر اسیداستیک ۳۳ درصد به عنوان حلال پر شدند و بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جذب نوری چاهک‌های رنگ شده با کریستال ویوله در ۴۹۲ نانومتر به وسیله دستگاه ELYSA Reader خوانده شد(۹)(جدول۱).

یافته‌ها

در این بررسی جهت تشخیص *اشرشیاکلی* یوروپاتوژن از نمونه‌های ادرار و هم‌چنین سوسپانسیون تهیه شده از پودر سنگ‌های ادراری که از بیماران گرفته شده بود، از محیط کشت‌های افتراقی زیر استفاده گردید که نتایج در جدول ۱ قابل مشاهده می‌باشد.

در شکل‌های ۱ و ۲ به ترتیب کلنی‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن(UPEC) با جلای فلزی سبز، شکل میکروسکوپی باسل گرم منفی و نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی با استفاده از محیط‌های کشت افتراقی نشان داده شده‌اند. در این بررسی پس از کشت بر روی محیط‌های افتراقی و همچنین تست‌های بیوشیمیایی مشخص گردید که ۳۸۰ نمونه از نمونه‌های ادرار بیماران دارای *اشرشیا کلی* یوروپاتوژن می‌باشد. از بین این نمونه‌ها ۳٤ نمونه دارای عفونت با *اشرشیا کلی* و به طور همزمان دارای سنگ ادراری می‌باشند، این سنگ‌ها حاوی *اشرشیاکلی* یوروپاتوژن بودند(نمودار ۱).

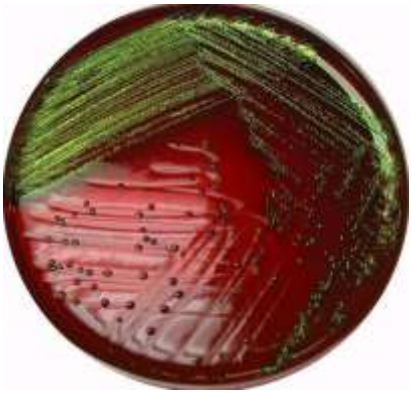
در این آزمایش برای بررسی تشکیل بیوفیلم UPEC از رنگ کریستال ویوله استفاده شد، این رنگ توانایی این را دارد که کل بیوفیلم‌های متصل شده به دیواره چاهک‌ها را رنگ کند. با استفاده از روش اتصال به کریستال ویوله(CV) توانایی تشکیل بیوفیلم در میان ایزوله‌های *اشریشیاکلی* تعیین شد. میزان تشکیل بیوفیلم *اشریشیاکلی* یوروپاتوژن بر روی سطح پلی‌استیرن برای هر ایزوله در OD_{492} نانومتر خوانده شد. ضمناً میزان cut-off برای نمونه‌ها به اندازه جذب نوری چاهک دارای محیط کشت بدون تلقیح باکتری که به آن هیچ لکه کریستال ویولت نچسبیده بود برابر با ۰/۱ محاسبه گردید. جدول ۲ محدوده مورد نیاز برای محاسبه بیوفیلم را نشان می‌دهد، از مجموع ۳۴ نمونه ۲۰ نمونه که ۵۹ درصد از نمونه‌ها را شامل می‌شد با جذب نوری بیش از ۰/۳، به طور قوی تشکیل بیوفیلم داده بودند. ۷ نمونه که ۲۰ درصد از نمونه‌ها را شامل می‌شد با جذب نوری ۰/۲ تا ۰/۳۹۹ به طور متوسط بیوفیلم تشکیل داده بودند. ۶ نمونه که ۱۸ درصد از نمونه‌ها را شامل می‌شد با جذب نوری ۰/۱ تا ۰/۱۹۹ به طور ضعیف و ۱ نمونه که ۳ درصد از نمونه‌ها را شامل می‌شد با جذب نوری ۰/۰۷ به صورت منفی گزارش گردید. نتایج حاصل از بررسی نشان داد که این باکتری توانایی تشکیل بیوفیلم بر روی سطح پلی‌استیرن را داشت. در شکل ۳ تشکیل بیوفیلم UPEC، در جدول ۳ و در نمودار ۲ درصد تشکیل بیوفیلم این باکتری نشان داده شده است.

از میان باکتری‌های UPEC تشکیل دهنده بیوفیلم ۱۸ درصد قدرت بسیار کم، ۲۰ درصد قدرت متوسط و ۵۹ درصد دارای قدرت بسیار بالا برای اتصال و تشکیل بیوفیلم دارند، همچنین از بین آن‌ها ۳ درصد فاقد قدرت تشکیل بیوفیلم بودند(جدول ۴).

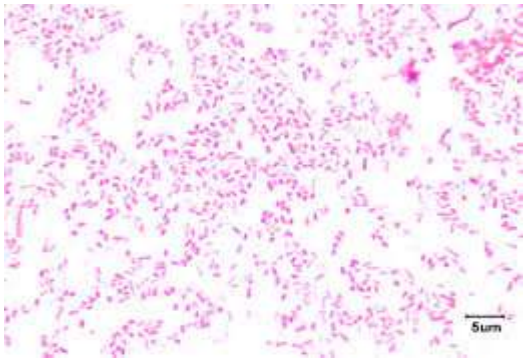
جدول ۱: محدوده مورد نیاز برای محاسبه بیوفیلم

بدون چسبندگی	چسبندگی ضعیف	چسبندگی متوسط	چسبندگی قوی
$OD \leq OD_c$	$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	$4 \times OD_c < OD$

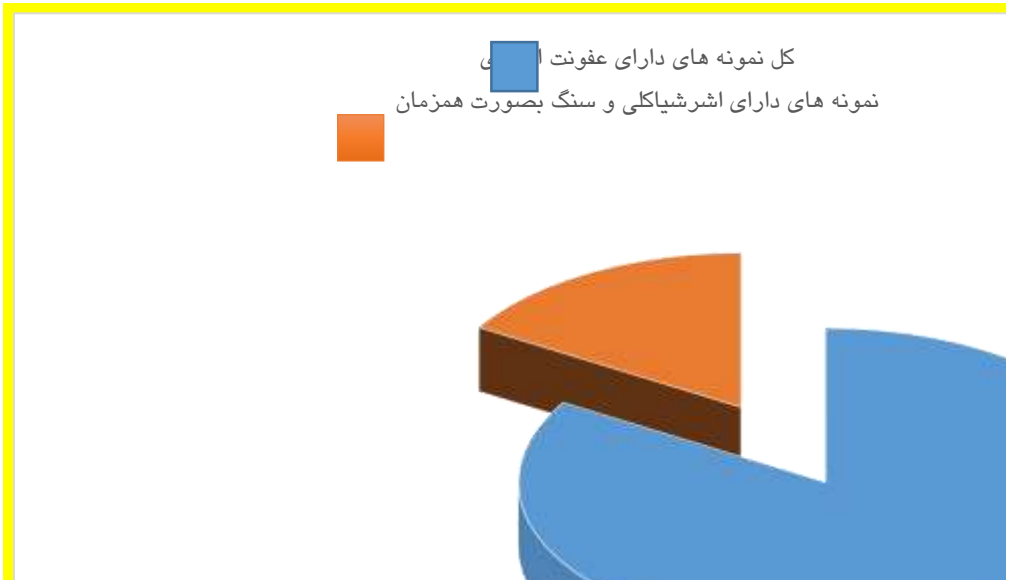
OD: *optical dencity* **OD_c**: *cut-off OD* *Value: OD_{492nm}*



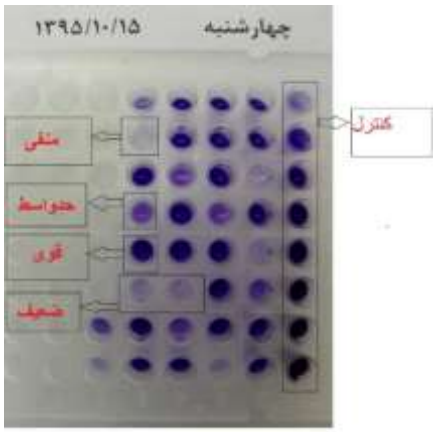
شکل۱: کلنی‌های با جلای فلزیUPEC



شکل۲: باسیل گرم منفی UPEC



نمودار ۱ : درصد بیماران دارای سنگ همراه با عفونت با *اشرشیا کلی*



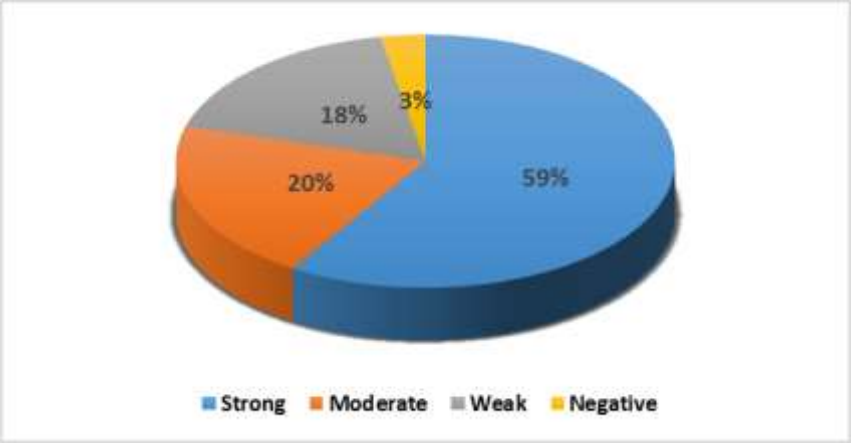
شکل۳: تشکیل بیوفیلم UPEC با روش میکروتیتر پلیت با استفاده از روش اتصال به کریستال ویوله (CV)

جدول ۲: نتایج جذب نوری نمونه‌ها

منفی	جذب نوری ضعیف	جذب نوری متوسط	جذب نوری قوی
۰/۱	۰/۱۵	۰/۳۲	۰/۵۶
	۰/۱۶۷	۰/۲۹	۰/۴۹
	۰/۱۱	۰/۳۳	۰/۵۵
	۰/۱۷	۰/۲۶	۰/۶۳
	۰/۱۴۹	۰/۳۰۴	۰/۴۴
	۰/۱۳۷	۰/۲۳	۰/۶۸
		۰/۳۶	۰/۵۷

جدول ۳: نتایج تشکیل بیوفیلم

ارگانیسم	بدون تشکیل بیوفیلم(درصد)	تشکیل بیوفیلم ضعیف(درصد)	تشکیل بیوفیلم متوسط(درصد)	تشکیل بیوفیلم قوی(درصد)	بدون ارگاسم
E.coli	(۳)۱	(۱۸)٦	(۲۰)۷	(۵۹)۲۰	۳۴



نمودار ۲: درصد تشکیل بیوفیلم UPEC

جدول ۴: نتایج تست‌های بیوشیمیایی جهت تأیید باکتری *اشرشیاکلی*

توضیحات	اشرشیاکلی
مصرف سیترات به عنوان منبع کربن	–
اندول	+
حرکت	+
مصرف قندها در محیط TSI و تولید گازCO_2از گلوکز	$A/A_{(gas)}$
اوره آز	–
جلای فلزی	+
سولفید هیدروژن(H_2S)	–
متیل رد	+
فارسیووگز پروسکوور	-

بحث

رشد بیوفیلم می‌تواند یک سبک زندگی خاص در مقایسه با شیوه غیر متصل(Planctonic) به نظر برسد و بیوفیلم شکل بگیرد(۹). این بررسی بر روی تشکیل بیوفیلم *اشریشیاکلی* یوروپاتوژن(UPEC) تمرکز می‌کند، این باکتری به طور معمول در چند ساعت پس از تولد در دستگاه گوارش نوزادان انسان کلونیزه می‌شود و با میزبان خودش برای دهها سال به طور همزیست زندگی می‌کند(۳ و۲). هدف از این مطالعه تعیین و بررسی قدرت تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت در باکتری اشرشیاکلی یوروپاتوژن جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری همراه با سنگ سیستم ادراری بود.

باکتری *اشرشیا کلی*، از میکروارگانیسم‌های بسیار مهم در ایجاد عفونت‌های ادراری در گروه‌های سنی مختلف می‌باشد. شیوع عفونت‌های ادراری در جوامع مختلف بسیار بالا است. مثلاً در ایالات متحده ۴۰ درصد زنان بزرگسال حداقل یک بار در طول عمرخود تجربه ابتلا به عفونت ادراری را دارند و حدود ۷ میلیون نفر در سال با عفونت ادراری به مراکز درمانی در ایالات متحده مراجعه می‌کنند که بیش از یک میلیارد دلار برای این افراد هزینه می‌شود. اشریشیاکلی عامل اصلی عفونت ادراری بوده و علت بیش از ۸۵ درصد سیستیت و پیلونفریت حاد، بیش از ۶۵ درصد سیستیت‌های عود کننده و علت حداقل ۳۵ درصد پیلونفریت عود کننده است. از طرفی مخزن سویه‌های UPEC، فلور مدفوعی است که باکتری به ناحیه مخاطی ادراری ـ تناسلی منتشر شده و به صورت بالا رونده به مثانه رسیده و به اپیتلیال ناحیه متصل می‌شود.

در بین *اشریشیاکلی*‌های مسبب عفونت ادراری، به مشخصات نسبتاً مشترک برخورده‌اند که آنها را عوامل بیماری‌زایی باکتری به حساب آورده و در قدرت تهاجم باکتری دخیل می‌دانند. این مشخصات شامل؛ وضعیت آنتی‌ژنیک(سروتیپ) خاص، توانایی گردآوری آهن از محیط، مقاومت در برابر سرم، توانایی همولیز و دارا بودن قدرت هیدروفوبیسیتی و تشکیل بیوفیلم است. در این بین، قدرت هیدروفوبیسیتی و تشکیل بیوفیلم به ویژه به خاطر آن که در اتصال باکتری به سلول میزبان و همچنین

سنگ‌های ادراری و استقامت آن در برابر مکانیسم‌های دفاع غیر اختصاصی بدن مؤثر است، از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. از آنجا که این خاصیت باکتریایی باعث ایجاد بیوفیلم خاص بر سطح سنگ‌های ادراری می گردد، توانایی تجمع زیاد در آن ناحیه و ایجاد عفونت‌های مربوط به این ارگان را دارا می‌باشد.

پس از اتصال به سطح سنگ، باکتری با اتکا به یک سطح مناسب جهت تشکیل بیوفیلم، تکثیر یافته و عفونت موضعی سیستیت می‌دهد. در صورتی که باکتری حرکت بالا رونده داشته باشد و به بافت کلیه برسد می‌تواند سبب ایجاد پیلونفریت شود. یکی از راه‌های کاهش دادن و محدود نمودن عفونت‌های حاد ادراری استفاده از آنتی‌بیوتیک است که در حال حاضر سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در حال افزایش هستند(۱۰).

تشکیل بیوفیلم سبب می‌شود که باکتری‌ها به عوامل ضدمیکروبی مقاوم شوند. این مقاومت بیوفیلم در برابر عوامل مخرب، جنبه‌های مضر فراوانی در زمینه‌های متفاوت از جمله صنعت دارد. اولین مرحله تشکیل بیوفیلم اتصال سلول‌های باکتری به سطوح می‌باشد که عوامل زیادی از جمله؛ حرکت باکتری‌ها، هیدروفوبیسیتی سطح آنها و جنس سطح مورد اتصال در آن نقش دارند(۱۱). توتسیکا و همکاران گزارش کردند که بالا بودن هیدروفوبیسیتی سطح سلول‌ها سبب می‌شود که باکتری تمایل بیشتری برای اتصال به سطوح داشته باشد در نتیجه سبب تشکیل شروع بیوفیلم و بروز اثرات مخرب آن می‌شود(۱۲). محققین زیادی به نقش و اهمیت هیدروفوبیسیتی بالا برای اتصال باکتری‌ها و تشکیل بیوفیلم اشاره کردند.

دلورتو و همکاران ارتباط بین هیدروفوبیسیتی و اتصال باکتری را تأیید کردند(۱۳).

این مطالعه نشان داد که باکتری‌ها برای تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح بر اساس خصوصیات سطحی مانند وجود کپسول، فیمبریه و هیدروفوبیسیتی سطح سلول انتخاب می‌شوند(۱۴).

در این بررسی از نظر توانایی تشکیل بیوفیلم، ۵۹ درصد از ایزوله‌ها قوی، ۲۰ درصد متوسط و ۱۸ درصد از آنها ضعیف بودند.

ترینچری از روش تشکیل بیوفیلم در لوله (Tube Method) استفاده کردند و نشان دادند که ۹/۴ درصد از ایزوله‌ها مثبت قوی(Strong Positive)، ۳۴/۴ درصد از ایزوله‌ها مثبت(Positive)، ۴۰/۶ درصد از ایزوله‌ها مثبت ضعیف(Weakly Positive) و ۱۵/۶ درصد منفی(Negative) بودند. که در مقایسه با روش میکروتیتر پلیت تشکیل بیوفیلم بیشتری را نشان دادند(۱۵).

برجی و همکاران از بین ۱۰۰ سویه *اشریشیا کلی یوروپاتوژن*، ۷۲ سویه فنوتیپ بیوفیلم مثبت را نشان دادند، از بین آنها ۱۷(۲۳/۶ درصد) مثبت ضعیف، ۱۹(۲۶/۳ درصد) مثبت و ۳۶ (۵۰ درصد) مثبت قوی بودند. نتایج این تحقیق در مقایسه با مطالعه حاضر میزان تشکیل بیوفیلم را بیشتر نشان داد که می‌تواند به علت پایین بودن سطح بهداشت،

افزایش میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و منابع جداسازی نمونه‌ها باشد(۱۶).

ژانل و همکاران از روش تشکیل بیوفیلم در لوله درپوشدار استفاده نمودند و نتایج نشان داد که از بین آنها ۸(۶/ ۲۶ درصد) مثبت ضعیف، ۱۷(۵۶/۶ درصد) مثبت و ۴ (۱۳/۳ درصد) مثبت قوی بودند(۱۷).

دایگل و همکاران به وسیله روش میکروتیتر توانایی باکتری *اشرشیا کلی* را در تشکیل بیوفیلم به اثبات رساندند(۱۸).

یکی از محدودیت‌هایی که با آن مواجه بودیم تکثیر چند باکتری پاتوژن به صورت همزمان بود که باعث ایجاد اختلال در کار می‌شد و باید فقط از اشرشیاکلی جهت تست آنتی‌بیوگرام استفاده می‌شد. از دیگر محدودیت‌ها می‌توان به عدم همکاری برخی از بیماران برای آنالیز و تست آنتی‌بیوگرام از ادرار ایشان نام برد که کهولت سن و بیماری‌های زمینه‌ای دیگر از مشکلات آنها بود، لذا پیشنهاد می‌گردد کسانی که در این زمینه قصد فعالیت دارند جهت شناسایی باکتری از روش‌های ملکولی استفاده نمایند تا از خطاهایی که منجر به شناسایی دیرهنگام باکتری می‌شود جلوگیری گردد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر، وجود همزمان عفونت به همراه سنگ‌های ادراری به عنوان یک سطح و بستر مناسب برای باکتری *اشریشیاکلی یوروپاتوژن* می‌تواند باعث ایجاد بیوفیلم بر سطح سنگ سیستم ادراری و در نتیجه ماندگاری طولانی مدت عفونت‌های دستگاه ادراری شود. نتیجه تشکیل بیوفیلم این باکتری بر سطح سنگ، باعث ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های ایجاد کننده عفونت دستگاه ادراری می‌شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم با کد ۹۳۵۴۸۶ می‌باشد و بدون حمایت مالی این دانشگاه انجام شد.

REFERENCES

1.Islam, Taqavi A, Nowruz J. Investigating the relationship between the common bacteria in urinary tract infection with labiophyneghad hospital. Journal of Shaheed Beheshti University of Medical Sciences & Health Services 2004; 30(2): 97-101.
2.Arbab Soleimani N, Amini Z, Tajbakhsh E. The study of attachment factor and biofilm formation of uropathogenic Escherichia coli isolated from patient with urinary tract infection of Semnan Province. Pejouhandeh 2014; 18(6):332-6.
3.Bruinsma G, van der Mei H, Bussher H. Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. Biomaterials 2001; 22: 3217–24.
4.Cerca N, Pier B. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of Staphylococcus epidermidis. J Res microbiol 2005; 156: 506-14.
5.Belion CH, Roux A and Ghigo JM. Escherichia coli Biofilms. Curr Top Microbial Immunal 2008; 322: 249-89.
6.Costerton JW. Overview of microbial biofilms. J Ind Microbiol 1995; 15: 137-40.
7.Daigle F, Harel J, Fairbrother JM, Lebel P.Expression and detection of pap, sfa, and afa-encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic Escherichia coli. Clin J Microbial 1994; 40: 286-91.
8.Dunne WMJr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? Clin Microbiol Rev 2002; 15: 155-66.
9.Divya S, Masilamani Selvam M. Invitro biofilm production of escherichia coli o157:h7 strain. Int JEnviron Microbiol 2011; 2(1): 290-4.
10.Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol Microbiol 1998; 30: 285–93.
11.Ghigo JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. Nature 2001; 412(6845): 442-5.
12.Totsika MDG, Moriel A, Idris BA, Rogers DJ, Wurpel MD. Phan et al. Uropathogenic escherichia coli mediated urinary tract infection, Curr. Drug Targets 2012; 13: 1386–99.
13.Dell'Orto VG , Belotti EA, Simonetti BG, Simonetti GD, Ramelli GP, Bianchetti MG, Lava SAG. Metabolic disturbances and renal stone promotion on treatment with topiramate: a systematic review. Br J Clin Pharmacol 2014; 77: 958.
14.Yasui T , Okada A, Usami M, Hamamoto SH, Ando R, Itoh Y, et al. Association of the loci 5q35.3, 7q14.3, and 13.q14.1 with urolithiasis: A case-control study in the Japanese population, involving genome-wide association study. J Urol 2013; 189: e854.
15.Trinchieri A. Epidemiology of urolithiasis: an update. Clin Cases Miner Bone Metab 2008;5(2): 101-6.
16.Borji A, Zahedani SS, Morad AV. *Escherichia coli* drug resistance isolated from urinary tract infections. ZUMS Journal 2001; 9(37): 28-32.
17.Zhanel GG, Karlowsky JA, Harding GKM. A Canadian national surveillance study of urinary tract isolates from outpatients: comparison of the activities of trimethoprim sulfamethoxazole,
ampicillin, mecillinam, nitrofurantoin, and ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(4): 1089-92.
18.Daigle F, Harel J, Fairbrother JM, Lebel P.Expression and detection of pap, sfa, and afa-encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic Escherichia coli. Clin J Microbial 1994; 40: 286-91

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

Original Article

Evaluating the Biofilm Ability by Microtiter Plate Method in Uropathogenic Escherichia Coli Isolated from Patients with Urinary Tract Infection with Urinary Stones

Bakhshi M[1],Jamali H[2*]

[1]Department of Pathology, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran,[2]Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

Received: 18 Apr 2019 Accepted: 03 May 2020

Abstract

Background and aim: Urinary tract infections are one of the most commonly reported nosocomial infections caused by colonization of E. coli in the mucosal epithelium and in the formation of microbial biofilms, which damage the host tissue. The aim of this study was to determine the amount of biofilm formation of uropathogenic E. coli based on urinary tract stones of patients with urinary tract infection.

Methods: This research is a quasi-experimental study using pre-test-post-test design which was conducted in 2015, 380 patients with positive urine culture with Escherichia coli bacteria were studied. Among the total population, 34 patients had urinary stone and urinary tract infection with E. coli simultaneously. These rocks were sent to the laboratory in accordance with sterile conditions. For long-term storage of bacteria for collection and other tests so that the bacteria themselves are not damaged, they were kept in glycerol stock. To determine the biofilm formation capacity, this bacterium was investigated by Microtiter Plate method.

Results: The results indicated that a total of 34 stone samples were examined using conventional methods containing uropathogenic E. coli. These microorganisms showed a low biofilm strength of 18%, very low power, 20% moderate power and 59% high power.

Conclusion: In present study, it was revealed that the concomitant presence of infection with urinary stones as a suitable surface and substrate for Escherichia coli, and as a result of the formation of biofilm of this bacterium on the surface of the stone, triggered further urinary tract infection and antibiotic resistance in some strains initiating urinary tract infections.

Keywords: Urinary Tract Infections, Uropathogenic E. Coli, Biofilm

[*]**Corresponding author: Jamali H,** Department Of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
Email: h.jamali1970@gmail.com.

Please cite this article as follows:
Bakhshi M, Jamali H. Evaluating the Biofilm Ability by Microtiter Plate Method in Uropathogenic Escherichia Coli Isolated from Patients with Urinary Tract Infection with Urinary Stones. Armaghane-danesh 2020; 25(4): 474-486.