پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال هجدهم، شماره ۶، پی در پی ۹۶، صفحات ۳۳۲ تا ۳۳۶
بهمن و اسفند ۱۳۹۲

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۴/۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۱/۱۵

بررسی عامل اتصال و تشکیل بیوفیلم در *اشریشیا کلی یوروپاتوژن* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در استان سمنان

*نازیلا ارباب سلیمانی[1]، زهرا امینی[*1]، الهه تاج بخش[2]*

۱. گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان
۲. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد

چکیده

سابقه و هدف: عفونت‌های دستگاه ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های بیمارستانی است که از کلونیزه شدن *اشرشیا کلی یوروپاتوژن* در اپیتلیوم مخاطی میزبان ناشی شده و به بافت میزبان آسیب می‌رساند. هدف از این مطالعه، تعیین تشکیل بیوفیلم *اشریشیا کلی یوروپاتوژن* و سنجش قدرت اتصالی (هیدروفوبیسیتی) آن در بیماران مبتلا به عفونت ادراری است.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۰۰ نمونه از کشت باکتری بیماران مشکوک به عفونت دستگاه ادراری جمع‌آوری شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری *اشریشیا کلی یوروپاتوژن* با استفاده از روش Kirby-Bauer مورد بررسی قرار گرفت. تشکیل بیوفیلم این باکتری، با روش میکروتیترپلیت انجام شد. به منظور بررسی اتصال باکتری، با استفاده از روش هیدروکربن اکتان، میزان هیدروفوبیسیتی سطح سلول *اشریشیا کلی یوروپاتوژن*، مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: از مجموع ۱۰۰ نمونه‌ی مورد بررسی به کمک روش های بیوشیمیایی متداول، ۷۰ نمونه به *عنوان اشریشیا کلی یوروپاتوژن* شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که باکتری *اشریشیا کلی یوروپاتوژن*، با هیدروفوبیسیتی ۲۳٪ توانایی تشکیل بیوفیلم را دارد. در این میان، ۶۰٪ قدرت بسیار بالایی برای تشکیل بیوفیلم داشته و فقط ۴٪ فاقد این قدرت بودند.

واژگان کلیدی: عفونت‌های دستگاه ادراری، *اشریشیا کلی یوروپاتوژن*، تشکیل بیوفیلم

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

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):332-336.

مقدمه

اشریشیا کلی، شایع‌ترین گونه‌ی باسیل گرم منفی در فلور مدفوعی است. این باکتری توانایی کلونیزه شدن و پایداری در میزبان‌های حیوانی، انسانی و محیط را دارد (۱). بعضی از سویه‌های *اشرشیا کلی* می‌توانند از سویه‌های کامنسال خود متمایز شده، بیماری‌زایی طبیعی بیشتر و جدی‌تری در دستگاه گوارش، بافت‌ها و سایر اندام‌های میزبان ایجاد کنند. این سویه‌های پاتوژن، به طور گسترده به عنوان *اشرشیا کلی* اسهال‌زا یا *اشرشیا کلی* پاتوژن خارج روده‌ای (Extra-intestinal Pathogenic *E.coli*; ExPEC) طبقه‌بندی می‌شوند. از میان باکتری‌های ExPEC، سویه‌های *اشرشیاکلی یوروپاتوژن* (*Uropathogenic E.coli*; *UPEC*) با بیماری‌زایی انسانی، در ارتباط است. سویه‌های *UPEC* به عنوان فرصت طلب داخل سلولی عمل کرده و با توجه به حساسیت و رفتار میزبان و توسط به کارگیری فاکتورهای ویرولان مختلف، برای کلونیزه شدن در دستگاه ادراری، برتری کسب می‌کنند (۲ و ۳).

عفونت‌های دستگاه ادراری، یکی از شایع‌ترین عفونت‌های بیمارستانی است که از کلونیزه شدن *UPEC* در اپیتلیوم مخاطی میزبان ناشی شده و به بافت میزبان آسیب می‌رساند (۴). *UPEC* در مجاری ادراری، می‌تواند در مثانه کلونیزه شده و ایجاد التهاب مثانه (Cystitis) کند. همچنین، قادر است از طریق حالب به کلیه‌ها صعود کرده و پیلونفریت (Pyelonephritis) ایجاد کند (۳).

*نویسنده مسؤول مکاتبات: **زهرا امینی**؛ گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، تلفن: ۵۲۴۴۷۲۳ (۰۲۳۲)؛ **پست الکترونیک:** Zahra_amini_63@yahoo.com

اتصال، اولین مرحله در ایجاد بیماری توسط باکتری‌ها است. تمام باکتری‌های بیماری‌زا باید ابتدا به سطوح مخاطی میزبان متصل شده و سپس با فاکتورهای ویرولان خود در برابر عوامل ضد اتصالی نظیر سیستم ایمنی مقابله و پس از تهاجم به داخل بدن و ترشح فرآورده‌های خود، بیماری ایجاد کنند. بسیاری از باکتری‌ها، تمایل دارند با سطوح انواع سلول‌های میزبانی، ارتباط برقرار کنند. این اتصال به سطوح را می‌توان گاهی با آگلوتینه شدن سلول‌های میزبانی نظیر اریتروسیت‌ها نشان داد. در این حالت، باکتری‌ها بین سلول‌ها، پل تشکیل می‌دهند. در بسیاری از موارد، باکتری‌ها به سطح سلول‌ها یا بافت‌ها، به ویژه مخاط‌ها، چسبیده و کلنی تشکیل می‌دهند (۵).

توانایی *UPEC* برای متصل شدن به بافت‌های میزبان، یکی از فاکتورهای برتری است که کلونیزاسیون *UPEC* را در دستگاه ادراری تسهیل می‌کند. چندین فاکتور سطحی مانند تاژک، پیلی یا فیمبریه، پروتئین‌های اتوترانسپورتر، کورلی، تولید اگزوپلی‌ساکارید و پیلی F جنسی، در تشکیل بیوفیلم دخیل هستند (۶).

هدف از این مطالعه، تعیین تشکیل بیوفیلم *اشریشیا کلی یوروپاتوژن*، سنجش قدرت اتصالی (هیدروفوبیسیتی) آن در بیماران مبتلا به عفونت ادراری است.

مواد و روش‌ها

باکتری *اشرشیا کلی* استفاده شده در این بررسی، از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری از بیمارستان‌های سطح استان سمنان جمع‌آوری شد. محیط‌های کشت مورد استفاده شامل ائوزین متیلن بلو (EMB) نوترینت آگار، مولر هینتون آگار (MHA)، BHI broth، لوریا برتانی براث (LB broth)، از شرکت Merck آلمان تهیه گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی استفاده شده برای بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی شامل آمپی‌سیلین (AM(10µg، آمیکاسین (AN(30µg، کوتریموکسازول (SXT(1.25/23.75µg،جنتامایسین (GM(10µg، سیپروفلوکسازین (CP(5µg و نیتروفورانتوئین (FM(10µg، از شرکت پادتن طب تهران خریداری شدند.

تعداد ۱۰۰ نمونه از کشت ادراری افراد مبتلا به عفونت مجاری ادراری جمع‌آوری شدند. سپس، به منظور جداسازی *اشرشیا کلی* و اطمینان از خالص بودن نمونه‌ها، هر کدام از نمونه‌ها به طور مجزا، ابتدا بر روی محیط کشت EMB آگار و سپس بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شده و با آزمایش‌های بیوشیمیایی متداول نظیر TSI، SIM، سیمون سیترات و اوره برای انتروباکتریاسه، باکتری *اشرشیا کلی* تأیید شد. سویه‌های تأیید شده‌ی *اشریشیا کلی*، با روش گلیسرول استوک برای ذخیره‌سازی (در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند تا در آزمایشات دیگر، مورد استفاده قرار گیرند.

برای تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی، از روش دیسک پلیت Kirby-Bauer استفاده شد (۱). ابتدا کشت تازه‌ی ۲۴ ساعته از باکتری در محیط کشت نوترینت آگار تهیه و سپس از کلنی‌های ظاهر شده بر سطح محیط کشت سوسپانسیونی معادل استاندارد نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ cfu $ml^{-۱}$) تهیه شد. به کمک سوآپ استریل، از هر باکتری روی محیط MHA به صورت متراکم، کشت داده شد. پس از ۵ دقیقه که رطوبت ناشی از سوسپانسیون باکتری‌ها جذب محیط شد، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد نظر برای هر باکتری، به کمک پنس استریل با رعایت فاصله‌ی هر دیسک از دیگری و نسبت به لبه‌ی پلیت، روی محیط MHA قرار داده شد. پلیت‌های حاوی باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرماگذاری شدند. پس از این مدت، هاله‌های عدم رشد، اندازه‌گیری و با جدول استاندارد آنتی‌بیوتیک‌ها، بررسی شدند (۷).

در بررسی تشکیل بیوفیلم *UPEC*، از روش میکروتیتر پلیت استفاده شد (۸). ابتدا یک لوپ پر از کلنی باکتری به یک لوله حاوی ۵ میلی‌لیتر لوریا برتانی (LB) تلقیح و این لوله به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، گرماگذاری شد. پس از گذشت این مدت و فعال شدن باکتری‌ها، ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری برداشته و به لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط استریل LB، تلقیح شد. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر در داخل چاهک‌های میکروتیتر پلیت ریخته شد. در چاهک شاهد، فقط محیط کشت استریل LB قرار داده شد و به مدت۲۴ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، گرماگذاری شد. سپس، محتوی داخل چاهک‌ها، خالی و شستشوی چاهک‌ها ۳ بار با سرم فیزیولوژی استریل انجام شد. پلیت‌ها به شدت تکان داده شدند تا سلول‌های غیر متصل حذف شوند. ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ به چاهک‌ها اضافه گردید تا سلول‌ها تثبیت شوند. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه، محتوبات چاهک‌ها تخلیه و در دمای آزمایشگاه، سطح پلیت‌ها خشک گردید. چاهک‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر از کریستال ویوله ۲٪ (CV) به مدت ۵ دقیقه، رنگ‌آمیزی شدند. بعد از ۵ دقیقه ، چاهک‌ها با آب شهری به آرامی شسته و با ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳٪ به عنوان حلال، پر شدند. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون پلیت‌ها در دمای

۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، جذب نوری چاهک‌های رنگ شده با کریستال ویوله در طول موج ۴۹۲ نانومتر، توسط دستگاه ELISA Reader خوانده شد.

برای بررسی هیدروفوبیسیتی *UPEC*، از هیدروکربن اکتان، به عنوان یک سطح مورد اتصال (MATH)، استفاده شد. ابتدا، کشت ۱۸ تا ۲۰ ساعته از باکتری در لوله‌های حاوی محیط کشت لوریا برتانی براث در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد، تهیه و به منظور جمع‌آوری سلول‌های باکتری، لوله‌ها به وسیله‌ی دستگاه ساتنریفیوژ با دور ۵۰۰۰ rpm ، در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند.

سپس، مایع رویی خارج و به رسوب حاصل، بافر فسفات (PBS) اضافه شد. از رسوب، سوسپانسیونی با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. در مرحله‌ی بعد، ۳/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون، برداشته و به لوله‌ی کووت منتقل و جذب نوری آن در طول موج ۶۴۰ نانومتر خوانده شد. این جذب نوری، به عنوان جذب نوری اولیه یا A گزارش گردید.

سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از هیدروکربن اکتان، به هر سوسپانسیون اضافه و به مدت ۱۲۰ ثانیه با دور متوسط، ورتکس شد. لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در یک محل بدون حرکت قرار داده شد تا فاز آبی و آلی از هم جدا شوند. سپس جذب نوری فاز آبی در طول موج ۶۴۰ نانومتر، خوانده شد و به عنوان جذب ثانویه یا B ثبت گردید. نتایج حاصله به صورت درصد هیدروفوبیسیتی یا اتصال سلول‌های باکتری به هیدروکربن اکتان، با استفاده از فرمول ۱، محاسبه گردید (۹).

$$\text{درصد هیدروفوبیسیتی} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

فرمول ۱.

یافته‌ها

پس از تست‌های بیوشیمیایی بر روی ۱۰۰ نمونه‌ی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری، ۷۰ نمونه *اشریشیا کلی* جدا شد.

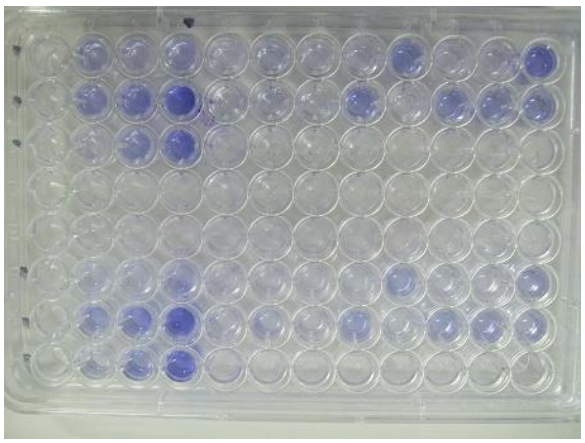
در بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی که به روش دیسک پلیت Kirby–Bauer انجام شد ۷۲٪ (۵۱ مورد) از ایزوله‌ها مقاوم به آمپی‌سیلین، ۴۲٪ (۳۰ مورد) مقاوم به کوتریموکسازول، ۲۲٪ (۱۶ مورد) مقاوم به سیپروفلوکسازین، ۱۸٪ (۱۳ مورد) مقاوم به جنتامایسین، ۴٪ (۳ مورد) مقاوم به نیتروفورانتوئین بودند و تمام ایزوله‌ها نسبت به آمیکاسین حساسیت نشان دادند.

در جدول ۱، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *E. coli* با استفاده از روش Kirby-Bauer، نشان داده شده است.

جدول ۱: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *E.coli* با استفاده از روش کربی-بوئر.

آنتی بیوتیک‌ها	مقاوم (تعداد) درصد	نیمه حساس (تعداد) درصد	حساس (تعداد) درصد
آمپی‌سیلین	۷۲ (۵۱)	۴ (۴)	۲۴ (۱۵)
کوتریموکسازول	۴۲ (۳۰)	۰ (۰)	۵۸ (۴۰)
سیپروفلوکسازین	۲۲ (۱۶)	۰ (۰)	۷۸ (۵۴)
جنتامایسین	۱۸ (۱۳)	۰ (۰)	۸۲ (۵۷)
نیتروفورانتوئین	۴ (۳)	۰ (۰)	۹۶ (۶۷)
آمیکاسین	۰ (۰)	۰ (۰)	۱۰۰ (۷۰)

در بررسی تشکیل بیوفیلم، از میان باکتری‌های تشکیل‌دهنده‌ی بیوفیلم، ۲۰٪ قدرت بسیار کم، ۱۶٪ قدرت متوسط و ۶۰٪ قدرت بسیار بالایی برای اتصال و تشکیل بیوفیلم داشتند. همچنین، از بین آنها، ۴٪ فاقد قدرت تشکیل بیوفیلم بودند (شکل ۱). میزان هیدروفوبیسیتی باکتری *UPEC* با آزمون اتصال میکروبی به هیدروکربن (MATH)، ۲۳٪ بود.



شکل۱: تشکیل بیوفیلم *UPEC* با روش میکروتیتر پلیت.

بحث

در این مطالعه، باکتری *اشریشیا کلی یوروپاتوژن*، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نسبت به آمپی‌سیلین و کمترین حساسیت را نسبت به آمیکاسین نشان داد. این نتایج، با برخی مطالعات دیگر مشابه بود. میلانی و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که ۹۵/۳٪ از ایزوله‌ها، بیشترین مقاومت را نسبت به آمپی‌سیلین و کمترین مقاومت را به آمیکاسین (۶/۶٪) و سیپروفلوکسازین (۱۰/۲٪) دارند. با توجه به نتایج این تحقیق، میزان مقاومت به آمپی‌سیلین نسبت به یافته‌های ما بیشتر

بوده است (۱۰). منصوری و همکاران در سال ۲۰۱۰ دریافتند که میزان مقاومت به سیپروفلوکسازین ۴۱٪، جنتامایسین ۳۴/۸٪ و کوتریموکسازول ۹۳/۵٪ است (۱۱) که در مقایسه با مطالعه‌ی ما، از مقاومت بالاتری برخوردار بوده است. این امر، می‌تواند به علت تفاوت مناطق جغرافیایی و منابع جداسازی باکتری باشد. در مطالعه‌ای که توسط Mattai و همکارانش در سال ۲۰۰۴ صورت گرفت، نتایج مشابه این مطالعه به دست آمد (۱۲). باکتری‌های *اشریشیا کلی* جدا شده در این بررسی، بیشترین حساسیت را نسبت به آمیکاسین نشان دادند. خیرآبادی و همکارانش در سال ۲۰۱۱، حساسیت *اشریشیا کلی*‌های جدا شده از نمونه‌های ادراری را نسبت به آمیکاسین، ۹۸٪ گزاش کردند.

در این بررسی ۶۰٪ ایزوله‌ها از نظر توانایی تشکیل بیوفیلم، بسیار قوی بودند. Ponnusamy و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که ۲۳/۶٪ از نظر توانایی تشکیل بیوفیلم بسیار قوی بودند (۴) که در مقایسه با تحقیق حاضر، میزان تشکیل بیوفیلم کمتری از خود نشان دادند. این مسأله می‌تواند به علت پایین بودن سطح بهداشت، افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و منابع جداسازی نمونه‌ها باشد. ارباب سلیمانی و همکاران، طی تحقیقی، میزان هیدروفوبیسیتی *اشریشیا کلی یوروپاتوژن* را ۵۰/۷۵٪ گزارش کردند (۱۳)، که در مقایسه با نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر، درصد بالاتری را نشان می‌دهد. Alhaji و همکاران در سال ۲۰۱۰، میانگین درصد هیدروفوبیسیتی را ۶۴/۹۷٪ محاسبه کردند (۱۴). دلیل اصلی تفاوت این دو تحقیق با مطالعه‌ی حاضر، می‌تواند تفاوت منطقه‌ای، سطح بهداشت و منابع جداسازی باکتری باشد.

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که تشکیل بیوفیلم باکتری *UPEC* باعث ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های ایجادکننده‌ی عفونت دستگاه ادراری می‌شود. همچنین، مشخص شد که باکتری *اشریشیا کلی یوروپاتوژن*، دارای قدرت اتصال به سطحی نظیر هیدروکربن اکتان، می‌باشد.

برای دستیابی به اطلاعات جامع و ارزیابی دقیق‌تر، پیشنهاد می‌شود که دیگر عوامل باکتریایی ایجاد کننده‌ی عفونت‌های ادراری در انسان، همچنین ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم این باکتری مورد مطالعه قرار گیرد و نیز برای پیشگیری از مقاومت این باکتری به آنتی بیوتیک‌ها، بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی قبل از تجویز دارو و درمان، در دستور کار آزمایشگاه‌های تشخیص طبی قرار گیرد.

REFERENCES

1. Johnson DE, Lockatell CV, Russell RG, Hebel JR, Island MD, Stapleton A, et al. Comparison of *Escherichia coli* strain recovered from human cystitis and pyelonephritis infections in transurethrally challenged mice. Infect Immun 1998;66:3059–65.

2. Johnson JR, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad E coli". J Lab Clin Med 2002; 139:155–62.

3. Marrs CF. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? FEMS Microbiol Lett 2005;252:183–90.

4. Ponnusamy PNV. In vitro biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* and their antimicrobial susceptibility pattern. Asian Pac J Trop Med 2012;5(3):210–3.

5. Hanna A, Berg M, Stout V, Razatos A. Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 2003;69(8):4474–81.

6. Soto SM, Smithson A, Martinez JA, Horcajada JP, Mensa J, Vila J. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* Strains: relationship with urovirulence factors and antimicrobial resistance. J Urol 2007;177:365–8.

7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 15th (M100-s15). National Committee for Clinical Informational Supplement Laboratory Standards Wayne. 2005.

8. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabić–Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Meth 2000;40:175–9.

9. Rosenberg MEL. Bacterial adherence to polystyrene: A replica method of screening for bacterial hydrophobicity. Appl Env Microbiol 1981;42(2):375–7.

10. Milani M, Nahaei MR, Lotfipour F, Yousefee S. Antibiotic sensitivity of prevalent bacteria isolated from urinary tract infection. Pharm Sci 2008;47–53.

11. Mansouri M, Abbasi S. Prevalence of multiple drug resistant clinical isolates of extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in southeast Iran. IJMS 2010;5(2):101–8.

12. Mathai D, Jones RN, Pfaller MA. Epidemiology and frequency of resistance among pathogens causing urinary tract infection in 1,510 hospitalized patients: a report from the SENTY Antimicrobial Surveillance Program (North America). Diag Microbiol Infect Dis 2004;40:129–36.

13. Arbab Soleimani N, Kasra Kermanshahi R, Yakhchali B, Nejad Sattari T. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli against Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis. Afr J Microbiol Res 2010;4(20):2169–73.

14. Brima Gogra A, Yao J, Sandy EH. Cell surface hydrophobicity (CSH) of *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus* and *Aspergillus niger* and the biodegradation of diethyl phthalate (DEP) via microcalorimetry. J Am Sci 2010;6(7):78–88.