مقاومت نسبت به خانواده کینولون ها در میان سویه های اشرشیا کلای مولد بیوفیلم جداشده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در زاهدان در سال ۱۳۹۶

مریم آورزمانی[۱]، فاتح رحیمی[۲]*، علی قاسمی[۳]

۱- دانشجوی کارشناس ارشد میکروبیولوژی-میکروبیهای بیماریزا، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۲- دکتری تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۳- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان

*نشانی برای مکاتبه: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، بخش میکروبیولوژی
f.rahimi@sci.ui.ac.ir

دریافت مقاله: مرداد چهار صد پذیرش برای چاپ: آبان چهار صد

چکیده

زمینه و هدف: عفونت دستگاه ادراری از شایعترین و پیچیده ترین عفونتهای باکتریایی در انسان به شمار می رود که سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک به عنوان عامل ایجاد بیش از ۷۵ درصد از عفونتهای دستگاه ادراری در جهان شناخته می شوند. جدایه های *اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک* قادر به تشکیل بیوفیلم هستند که باعث مقاومت آنها در برابر آنتی بیوتیکهای مختلفی از قبیل کینولون ها می شود و این امکان را فراهم می سازد که باکتریها بتوانند در دستگاه ادرای حضور داشته باشند و به عنوان مخزنی برای ایجاد عفونتهای عودشوند فعالیت نمایند. در این مطالعه الگوی مقاومت نسبت به کینولون ها در میان سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک جداسازی شده از بیماران مبتلا به عونت ادراری در یک بیمارستان در زاهدان تعیین گردید.

روش کار: در این مطالعه در مجموع، ۸۱ جدایه *اشرشیا کلای* از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در یک بیمارستان مرجع در شهر زاهدان جمع آوری گردید. جدایه ها پس از کشت بر روی محیطهای ژلوز مک کانکی و ژلوز ائوزین متین بلو با آزمون PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *tuf*A مورد شناسایی قرار گرفتند. جهت تعیین سویه های مولد بیوفیلم از آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو استفاده گردید و مقاومت سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم نسبت به آنتی بیوتیکهای نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین، اوفلوکساسین و نورفلوکسین به روش انتشار از دیسک و بر اساس دستورالعملهای CLSI تعیین گردید.

یافته‌ها: تمامی جدایه های جمع آوری شده واجد ژن *tuf*A بودند و به عنوان سویه های *اشرشیا کلای* مورد شناسایی و تأیید قرار گرفتند. با استفاده از آزمون کیفی ژلوز قرمز مشخص گردید که ۷، ۸۷ و ۶ درصد سویه ها به ترتیب قادر به تشکیل مورفوتایپهای rdar، bdar و pdar بودند و به عنوان سویه های بیوفیلم مثبت انتخاب شدند. علاوه بر این، ۱۸ سویه نسبت به تمامی آنتی بیوتیکهای انتخابی حساسیت نشان دادند و ۶۴ درصد سویه ها نیز مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند. همچنین، ۵۶، ۵۰، ۵۰ و ۴۸ درصد سویه ها نیز به ترتیب نسبت به نالیدیکسیک اسید، لووفلوکساسین، اوفلوکساسین و نورفلوکساسین مقاومت نشان دادند. علاوه بر این، ۶ الگوی مقاومتی نیز در میان سویه ها شناسایی گردید که الگوی شماره ۶ (مقاومت به تمامی آنتی بیوتیکها) به عنوان الگوی غالب در این مطالعه انتخاب گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان دهنده فراوانی بالای سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم و مقاوم به خانواده کینولون ها در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری در بیمارستان مورد مطالعه در زاهدان است.

واژگان کلیدی: *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، عفونت ادراری، کینولون ها ، بیوفیلم، ژلوز قرمز کنگو، زاهدان

مقدمه

عفونتهای ادراری به عنوان دومین عفونت شایع باکتریایی در انسان (پس از عفونتهای تنفسی) شناخته می شود. این عفونت در خانمها، به دلیل آناتومی خاص دستگاه ادراری و دسترسی سریع باکتریهای بیماریزا به مجرای ادراری و مثانه و متعاقبا کلیه ها، در مقایسه با آقایان از شیوع بالاتری برخوردار است؛ به طوریکه تقریبا نیمی از خانمها در طول زندگی خود حداقل یک بار با این عفونتها مواجه می شوند. در ۴۰-۲۰ درصد موارد، عود مجدد عفونت پس از بهبودی نسبی مشاهده می شود(۱, ۲). عفونت ادراری، شامل عفونتهای اکتسابی از بیمارستان و عفونتهای اکتسابی از جامعه است که خانمها گروه غالب مبتلایان به عفونتهای اکتسابی از جامعه را تشکیل می دهند(۳). اختلالات دستگاه ادراری در دفع ادرار و تخلیه مثانه نیز خطر ابتلا به این نوع عفونتها را افزایش می دهند. عفونت مجاری ادراری می تواند در هر دو جنس در سنین مختلف رخ دهد اما خانمهای باردار، نوزادان و افراد مسن بیشتر در معرض خطر ابتلا به این بیماری قرار دارند (۴). علاوه بر این، احتمال ابتلا به عفونت ادراری در میان نوزادان پسر شیرخوار شایعتر از نوزادان دختر است؛ اما با افزایش سن، احتمال ابتلای دختر بچه ها به این عفونتها بیشتر می شود. پس از ۵۰ سالگی، به دلیل افزایش اندازه پروستات در آقایان و طبیعتا اثر انسدادی آن احتمال ابتلا در هر دو جنس یکسان است(۵).

جنسهای مختلف خانواده انتروباکتریاسه از عوامل مهم و اصلی ایجاد عفونت ادراری محسوب می شوند که در این میان اشرشیا کلای به عنوان عامل ایجاد ۷۵-۹۰ درصد این عفونتها به شمار می رود(۶). این باکتری عامل ایجاد ۸۰ درصد عفونتهای غیرپیچیده ادراری، ۹۵ درصد عفونتهای اکتسابی از جامعه و ۵۰ درصد عفونتهای اکتسابی از بیمارستان می باشد(۷). کلبسیلا نومونیه، پروتئوس، گونه های انتروباکتر، سیتروباکتر، گونه های انتروکوکوس، استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از دیگر عوامل مهم ایجاد عفونت ادراری به شمار می روند. سویه های اشرشیا کلای، به عنوان نرمال بایوتا دستگاه گوارش بدون ایجاد هرگونه عفونتی در بدن انسان ساکن هستند، اما برخی سویه ها با کسب عوامل بیماریزایی قادر به ایجاد عفونتهای خارج روده ای و داخل روده ای از قبیل بیماری اسهالی شبه کلرا، مننژیت و گندخونی می باشند(۲). سویه های اشرشیا کلای جداسازی شده از دستگاه ادراری، اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک (UPEC) خوانده می شوند(۸).

یکی از دلایل اصلی عود عفونت ادراری، توانایی تولید بیوفیلم و همچنین تشکیل اجتماعات باکتریایی داخل سلولی توسط اشرشیا کلای است. تشکیل بیوفیلم یک فرآیند ۵ مرحله ای است که با اتصال باکتریهای پلانکتونیک به صورت برگشت پذیر به سطوح آغاز می شود؛ سپس با تغییر در بیان ژنها و تولید عوامل چسبندگی مختلف، باکتری به صورت برگشت ناپذیر به سطوح متصل شده و شروع به تولید ماتریکس پلی ساکاریدی از جنس پلی گلوکزآمین و اسید کلانیک می کند. در نهایت پس از رشد و بلوغ بیوفیلم، در مرحله آخر که با تغییر حالت به فاز پلانکتونیک همراه است؛ جدا شدن باکتریهای منفرد از سطح بیوفیلم و ایجاد بیوفیلمهای جدید در سایر نقاط بدن، باعث ایجاد عفونتهای عودشونده می شوند(۹). تشکیل این اجتماعات سلولی از باکتریها در برابر جریان ادرار، سازوکارهای دفاعی بدن میزبان و داروهای ضد میکروبی محافظت می کند. در سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک عوامل چسبندگی مختلفی از جمله فیمبریه تایپ 1، فیمبریه P، کورلای، آنتی ژن 43 و فیمبریه S در تشکیل بیوفیلم و اتصال به بافتهای میزبان نقش دارند. از دیگر عوامل اتصالی می توان به پیلی جنسی (F) و چندین پروتئین اتوترانسپورتر اشاره کرد. فیمبریه ها در مراحل اولیه اتصال و تشکیل بیوفیلم نقش دارند(۱۰).

کورلای الیاف نازک، پیچ خورده و آمیلوییدی درهم و بی شکلی است که در بسیاری از اعضای خانواده انتروباکتریاسه وجود دارد و از اجزاء اصلی پروتئینهای تشکیل دهنده بیوفیلم در اشرشیا کلای محسوب می شود که در اتصال اولیه و اجتماع سلولهای باکتریایی نقش دارد و توسط دو خوشه ژنی csgAB و csgDEFG رمزگذاری می شود که بیان آن تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی مانند دما، اسمولاریته محیط و اکسیژن قرار می گیرد. سلولز یکی از ترکیبات اصلی موجود در ماتریکس بیوفیلم است که سنتز آن توسط ژن csgD با واسطه تحریک adrA و سنتز یک پروتئین غشای داخلی به صورت مثبت تنظیم می‌شود. سنتز همزمان کورلای وسلولز در اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک بسیار معمول است و باعث ایجاد یک بستر آب گریز و خشن می شود(۴).

مقاومت آنتی بیوتیکی یک مشکل اساسی در روند درمان و کنترل عفونتها است که علاوه بر شکست درمان، موجب گسترش مقاومت در میان سایر جنسها و گونه های باکتریایی می شود(۵). اعضای خانواده انتروباکتریاسه به طور معمول نسبت به اغلب آنتی بیوتیکها مقاوم هستند. این مقاومت ناشی از سازوکارهای ذاتی و اکتسابی است. کینولون ها از جمله آنتی بیوتیکهایی هستند که به طور گسترده ای در درمان عفونتهای ادراری، تنفسی و دستگاه گوارش ناشی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی نقش دارند و از اواخر دهه ۱۹۸۰ برای درمان بسیاری از عفونتهای اکتسابی از جامعه و بیمارستان مورد استفاده قرار گرفته اند(۱۱, ۱۲). اعضای این خانواده، از مشتقات کوینولونیک کربوکسیلیک با فعالیت باکتری کشی با طیف اثر وسیع، سطح سرمی و جذب خوراکی بالا و اثرات جانبی نسبتا پایین هستند که بعد از عرضه به بازار مصرف، در زمان بسیار کوتاهی به عنوان اولین خط درمان عفونت دستگاه ادراری ناشی از باسیلهای گرم منفی مورد استفاده قرار گرفتند(۱۳). هدف فلوروکینولون ها DNA جیراز و توپوایزومراز IV در باکتریها است که مانع از همانند سازی در باکتریها می شوند(۱۴). معمولا مقاومت نسبت به فلوروکینولون ها در باکتریها به سرعت ایجاد می شود. از

مهمترین سازوکارهای ایجاد مقاومت، جایگزینی اسیدهای آمینه در مناطق تعیین کننده مقاومت نسبت به کینولون ها در جایگاه فعال آنزیمها، بیان پمپهای افلاکس و تغییر نفوذپذیری غشاء خارجی است(۱۱, ۱۴). پلاسمیدها نیز یکی از عناصر ایجاد مقاومت نسبت به کینولون ها هستند. تاکنون سه سازوکار برای مقاومت به واسطه پلاسمید شناسایی شده است که شامل محافظت از توپوایزومراز با واسطه پروتئینهای Qnr، بیان پمپهای افلاکس QepA1، QepA2 و OqxAB و حضور آنزیمهای مهار کننده فلوروکینولون ها ی سنتتیک مانند آمینوگلیکوزید استیل ترانسفراز می باشد. این مطالعه با هدف تعیین مقاومت نسبت به خانواده کینولون ها در میان سویه های اشرشیا کلای مولد بیوفیلم جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه کننده به یک بیمارستان مرجع در شهر زاهدان به انجام رسیده است.

روش کار

در این مطالعه در طی سال ۱۳۹۶ در مجموع ۸۱ جدایه اشرشیا کلای جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در یک بیمارستان مرجع در شهر زاهدان به صورت هفتگی جمع آوری گردید و با رعایت شرایط استاندارد، به آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه اصفهان منتقل شد. در ابتدا، تمام جدایه ها بر روی محیط ژلوز مک کانکی (Merck, Germany) کشت داده شدند و کلنیهای با رنگ صورتی به عنوان جدایه های مشکوک به اشرشیا کلای بر روی محیط ژلوز ائوزین متیلن بلو (Merck, Germany) کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند(۱۵). پس از گذشت این مدت، کلنیهای واجد جلای سبز فلزی به عنوان جدایه های اشرشیا کلای مورد شناسایی و تأیید اولیه قرار گرفتند و با استفاده از آزمون PCR و پرایمرهای اختصاصی ژن tufA مورد تأیید قرار گرفتند.

به منظور استخراج DNA از کلنیهای واجد جلای سبز فلزی بر روی محیط ژلوز ائوزین متیلین بلو از روش جوشاندن بر اساس دستورالعمل پیشین Kai-Larsen استفاده گردید(۱۶). به طور خلاصه، یک کلنی از هر جدایه باکتریایی به یک میکروتیوب واجد ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل منتقل و به خوبی ورتکس و حل گردید. سپس، میکروتیوبها به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شده و به مدت ۱۵ دقیقه در g × ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و در نهایت ۲ میکرولیتر از سوپرناتانت به عنوان الگوی DNA جهت انجام آزمون PCR مورد استفاده قرار گرفت.

جهت شناسایی و تأیید جدایه هایی که در بیمارستان به عنوان اشرشیا کلای شناسایی شده بودند و واجد کلنیهای صورتی بر روی محیط ژلوز مک کانکی و کلنیهای ارغوانی تیره همراه با جلای فلزی بر روی ژلوز ائوزین متیلن بلو بودند، از پرایمرهای اختصاصی ژن tufA و آزمون PCR بر اساس برنامه و دستورالعملی که پیشتر توسط Vareille و همکاران معرفی شده بود استفاده گردید(۱۷).

به منظور بررسی قابلیت تشکیل بیوفیلم در میان سویه های اشرشیا کلای از روش کیفی ژلوز قرمز کنگو استفاده گردید (۴). بر این اساس هر سویه به صورت خطی بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو کشت داده شد و سپس پلیتها به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. در نهایت سویه ها بر اساس توانایی تولید/عدم تولید کورلای و سلولز واجد یکی از چهار مورفوتایپ rdar (تولید کورلای و سلولز)، bdar (تولید کورلای و عدم تولید سلولز)، pdar (تولید سلولز و عدم تولید کورلای) و saw (عدم تولید کورلای و سلولز) بودند و مورفوتایپهای rdar، bdar و pdar به عنوان بیوفیلم مثبت انتخاب شدند.

پس از تعیین سویه های اشرشیا کلای مولد بیوفیلم، جهت بررسی مقاومت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیکهای خانواده کوینولون از آزمون انتشار از دیسک بر اساس دستورالعمل Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) استفاده گردید(۱۸). دیسکهای آنتی بیوتیکی انتخاب شده جهت این مطالعه شامل سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، اوفلوکساسین (۵ میکروگرم)، نورفلوکساسین (۱۰ میکروگرم)، لووفلوکساسین (۵ میکروگرم) و نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم) بودند که از شرکت پادتن طب تهیه شدند و صحت عملکرد این دیسکها به صورت تصادفی با دیسکهای آنتی بیوتیکی شرکت Mast (UK) مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته ها

تمامی ۸۱ جدایه ای که از آزمایشگاه بیمارستان به عنوان اشرشیا کلای جمع آوری شده بودند؛ بر روی محیط ژلوز مک کانکی واجد کلنیهای صورتی رنگ و بر روی محیط ژلوز ائوزین متیلن بلو واجد کلنیهای ارغوانی تیره همراه با جلای سبز فلزی بودند که تأیید کننده نتایج حاصل از شناسایی جدایه ها در آزمایشگاه بیمارستان مورد مطالعه بود. این جدایه ها در آزمون PCR با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی ژن tufA نیز واجد باند ۲۰۰ جفت بازی بودند و به عنوان سویه های اشرشیا کلای مورد تأیید نهایی قرار گرفتند و برای بررسیهای بیشتر انتخاب شدند.

بر اساس نتایج حاصل از آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو مشخص گردید که از مجموع ۸۱ سویه اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک جمع آوری شده از بیمارستان مورد مطالعه در شهر زاهدان، ۶۷ درصد سویه ها (۵۴ سویه) قادر به تشکیل مورفوتایپهای rdar، bdar و pdar بودند که به عنوان سویه های بیوفیلم مثبت انتخاب شدند. بر این اساس، ۷ درصد (۴ سویه) واجد مورفوتایپ rdar، ۸۷ درصد (۴۷ سویه) واجد مورفوتایپ bdar و ۶ درصد (۳ سویه) نیز واجد مورفوتایپ pdar بودند. در مجموع، ۳۳ درصد سویه ها (۲۷ سویه)

نیز فاقد توانایی تولید کورلای و سلولز بودند و کلنیهایی با مورفوتایپ saw را تشکیل دادند.

نتایج حاصل از تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های مولد بیوفیلم نسبت به آنتی بیوتیکهای خانواده کوینولون نشان داد که ۱۸ سویه (۳۳ درصد) نسبت به تمامی آنتی بیوتیکهای این خانواده حساسیت نشان دادند. همچنین، بیشترین میزان مقاومت (۳۴ سویه، ۶۳ درصد) نسبت به سیپروفلوکساسین مشاهده گردید و پس از آن مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید (۵۶ درصد)، لووفلوکساسین (۵۰ درصد)، اوفلوکساسین (۵۰ درصد) و نورفلوکساسین (۴۸ درصد) در مراتب بعدی قرار داشتند .

در این مطالعه، در مجموع ۶ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در میان سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک مشاهده گردید(جدول ۱). بر این اساس مشخص گردید که ۷ سویه (۱۳ درصد) حداقل نسبت به یک آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند و ۲۶ سویه (۴۸ درصد) نیز نسبت به هر ۵ آنتی بیوتیک مورد بررسی مقاوم بودند؛ بنابراین الگوی مقاومت شماره ۶ به عنوان الگوی غالب در این مطالعه انتخاب گردید. همچنین، ۴ درصد سویه ها نسبت به دو آنتی بیوتیک و ۲ درصد سویه ها نیز به سه آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند.

جدول ۱. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در زاهدان.۱۳۹۶

الگوی مقاومت	تعداد آنتی بیوتیک	نام آنتی بیوتیک	تعداد جدایه (درصد)
۱	۱	CIP	۵ (۹)
۲		NAL	۲ (۴)
۳	۲	CIP, NAL	۱ (۲)
۴		CIP, LVX	۱ (۲)
۵	۳	CIP, NAL, OFX	۱ (۲)
۶	۵	CIP, NAL, LVX, OFX, NOR	۲۶ (۴۸)

CIP: ciprofloxacin, NAL: nalidixic acid, LVX: levofloxacin, OFX: ofloxacin, NOR: norfloxacin

بحث

عفونت دستگاه ادراری یکی از شایعترین عفونتهای باکتریایی در انسان است که طیف وسیعی از میکروارگانیسمها به عنوان عوامل ایجاد عفونت ادراری شناخته می شوند که در این میان اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک به عنوان مهمترین عامل بیماریزا شناخته می شود. عفونت ادراری به طور کلی به سه گروه عفونت ادراری بدون علامت، سیستیت حاد و پیلونفریت تقسیم بندی می شود (۱۹). یکی از عوامل تعیین کننده قدرت بیماریزایی در باکتریها توانایی تشکیل بیوفیلم است که موجب بقا طولانی مدت سویه ها در دستگاه ادراری می شود (۱). میکروارگانیسمهایی که در یک بیوفیلم رشد می کنند، در برابر عوامل ضد میکروبی و داروها ۱۰۰۰-۱۰۰ برابر بیشتر از باکتریهای پلانکتونیک مقاومت نشان می دهند (۲۰). کورلای یا فیمبریه مجعد، یک پروتئین سطحی و کوچک است که به اجزای ماتریکس خارج سلولی مانند فیبرونکتین، لامینین، پلاسمینوژن و کلاژن متصل می شود و عامل اصلی چسبندگی به سطوح، اجتماعات سلولی و تشکیل بیوفیلم محسوب می شود. بیان کورلای با سنتز سلولز مرتبط است که با تولید یک ماتریکس خارج سلولی مستحکم، باعث ایجاد مورفوتایپهای خشن و آبگریز در اشرشیا کلای می شود (۲۱, ۲۲). کورلای، در برابر SDS و پروتئاز ها مقاوم است و از تمایل شیمیایی بالایی برای واکنش و اتصال به رنگهای کلاسیک مانند قرمز کنگو برخوردار می باشد. از این ویژگی برای بررسی خصوصیات فنوتیپی در آزمونهای سنجش تولید بیوفیلم استفاده می شود (۲۳, ۲۴). روشهای آزمایشگاهی مختلفی برای بررسی و ارزیابی تولید بیوفیلم در باکتریها وجود دارند، که شامل مشاهده با میکروسکوپهای کانفوکال و فلورسنت، استفاده از حسگرهای پیزوالکتریک، روشهای مبتنی بر بیولومینسانس، روش کمی میکروتیترپلیت، روش کیفی ژلوز قرمز کنگو و روش صفحه کشت بافت می باشند (۲۵).

در مطالعه رحیمی و همکاران بر روی ۱۲۴ جدایه اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک مشخص شد که در بررسی بیوفیلم به روش قرمز کنگو ۱۳ درصد جدایه ها واجد مورفوتایپ rdar، ۱۵ درصد واجد مورفوتایپ bdar و ۹ درصد نیز واجد مورفوتایپ pdar بودند. همچنین، ۶۳ درصد جدایه ها نیز فاقد توانایی سنتز کورلای و سلولز (بیوفیلم منفی) بودند (۲). قاسمی و همکاران در سال ۱۳۹۹ نشان دادند که ۶۸ درصد جدایه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک قادر به تشکیل بیوفیلم با واسطه تولید کورلای و سلولز بودند. همچنین، در میان سویه های بیوفیلم مثبت، ۷ درصد واجد مورفوتایپ rdar، ۸۸ درصد واجد مورفوتایپ bdar و ۵ درصد نیز واجد مورفوتایپ pdar بودند (۴). اهمیت حضور کورلای و سلولز برای تشکیل بیوفیلم، طی مطالعه Saldana و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز گزارش شده است،

به طوریکه در مطالعه آنها نیز، اغلب سویه های واجد کورلای و سلولز توانایی تولید بیوفیلم قوی داشتند (۲۶). در مطالعه نصرتی و همکاران که به منظور مقایسه روشهای کیفی ژلوز قرمز کنگو، کمی میکروتیتر پلیت و روش صفحه کشت بافت انجام گرفت، روش صفحه کشت بافت به عنوان روش استاندارد برای بررسی بیوفیلم معرفی شد و جدایه های اشرشیا کلای از نظر تولید بیوفیلم به چهار گروه قوی (۴۰ درصد)، متوسط (۲۲ درصد)، ضعیف (۲۸ درصد) و منفی (۱۰ درصد) تقسیم شدند. در مقابل تنها چهار جدایه توانایی تولید بیوفیلم قوی بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو داشتند و ۶۵ درصد بیوفیلم متوسط ایجاد کردند. علاوه بر این، حساسیت روش ژلوز قرمز کنگو (۳۹/۱ درصد) در مقایسه با روش میکروتیتر پلیت (۷۸/۳ درصد) بسیار کمتر گزارش شد (۲۷). به طور کلی، بر اساس مطالعات انجام گرفته در گذشته توسط نویسندگان این مقاله می توان اینگونه نتیجه گیری کرد که روش ژلوز قرمز کنگو در صورت تهیه صحیح و ترکیب دقیق مواد بر اساس دستورالعمل Romling (۲۸) یک روش اختصاصی و حساس جهت تعیین تولید کورلای و سلولز و غربالگری اولیه تشکیل بیوفیلم در میان جدایه های اشرشیا کلای محسوب می شود.

باکتریها پس از کلونیزاسیون در غشاهای مخاطی مجاری ادراری، تشکیل بیوفیلم می دهند. ساختار بیوفیلم به بسیاری از آنتی بیوتیکها غیرقابل نفوذ بوده و باعث ایجاد مقاومتهای چندگانه دارویی در باکتریها می شود. مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتریها یک مشکل جهانی است. در سالهای اخیر استفاده نامناسب و گسترده از داروهای ضد میکروبی موجب ظهور و گسترش جدایه های بیماریزای مقاوم به داروها شده است. در بیشتر کشورها از جمله ایران استفاده از آزمایشهای میکروبیولوژیکی برای درمان عفونت ادراری حاد و بدون عارضه، غیرضروری به نظر می رسد و آنتی بیوتیکها قبل از در دسترس بودن نتایج آزمایشگاهی به صورت تجربی تجویز می شوند (۲۹). چندین مطالعه نشان می دهند که در اروپا، آمریکای شمالی و جنوبی ۴۵-۲۰ درصد از جدایه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک نسبت به آنتی بیوتیکهای خط اول درمان مقاوم هستند (۳۰). فلوروکینولون ها ، به عنوان یکی از ۴ داروی ضد میکروبی برای درمان عفونت ادراری تجویز می شوند. سیپروفلوکساسین به علت جذب بالا از دستگاه گوارش، در بالین و در درمان تجربی به عنوان داروی اول برای درمان عفونت ادراری در بیماران سرپایی مورد استفاده قرار می گیرد؛ اما به علت استفاده گسترده از آن در طی چند دهه اخیر، مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک به طور قابل ملاحظه ای افزایش یافته است (۳۱). در مطالعه Hassan و همکاران ۹۵ درصد باکتریهای گرم منفی تولید کننده بیوفیلم به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند و در بررسی تشکیل بیوفیلم به روش ژلوز قرمز کنگو، ۳/۶ درصد جدایه ها بیوفیلم قوی و ۶/۳ درصد بیوفیلم متوسط تشکیل دادند (۲۵). در مطالعه نیکزاد و همکاران ۱۲/۵۲ درصد جدایه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند (۳۲). در بررسی کیفی تشکیل بیوفیلم به روش قرمز کنگو توسط Ponnusamy و همکاران، ۲۳ درصد سویه ها بیوفیلم قوی، ۳۷ درصد بیوفیلم متوسط و۴۰ درصد بیوفیلم ضعیف تشکیل دادند. همچنین، ۵۹ درصد جدایه های تشکیل دهنده بیوفیلم نسبت به نورفلوکساسین مقاوم بودند که در مقایسه با سویه های بیوفیلم منفی از مقاومت بیشتری برخوردار بودند که وجود ارتباط بین تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی بیوتیکی را توجیه می کند (۳۳). در مطالعه دیگر، ۸۹/۵ درصد جدایه های اشرشیا کلای جداسازی شده از سوندهای ادراری قادر به تشکیل بیوفیلم بودند که در بررسی الگوی مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی، ۸۷/۶ درصد جدایه های تشکیل دهنده بیوفیلم در روش ژلوز قرمز کنگو نسبت به بیش از ۶ آنتی بیوتیک مورد استفاده مقاومت نشان دادند (۳۴). در یک مطالعه که توسط مدنی و همکاران انجام گرفت، بیشترین میزان حساسیت مربوط به سیپروفلوکساسین (۶۶/۷ درصد) گزارش شد که منطبق با بررسیهای انجام گرفته در این تحقیق بود (۳۵). در مطالعه شریفی و همکاران که بر روی ۱۲۰ جدایه مرتبط با عفونت دستگاه ادراری در یاسوج انجام گرفت، ۴۸/۳ درصد جدایه ها به نالیدیکسیک اسید و ۲۸/۳۳ درصد جدایه ها نسبت به سیپروفلوکساسین مقاومت نشان دادند (۳۶). همچنین امینی و همکاران در کرمانشاه؛ میزان مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین را ۱۸/۲ درصد گزارش کردند که به عنوان مؤثرترین دارو برای درمان عفونت ادراری پیشنهاد گردید (۳۷). مقاومت سویه های جداسازی شده از بیماران بستری در بخش مراقبتهای ویژه در تبریز نسبت به نالیدیکسیک اسید، نورفلوکساسین، سیپروفلوکساسین و اوفلوکساسین به ترتیب ۵۷، ۳۴، ۳۳ و ۳۰ درصد تعیین گردید (۳۸). بر اساس مطالعه Subramanian و همکاران بر روی ۱۰۰ جدایه باکتریایی جداسازی شده از عفونت ادراری، اشرشیا کلای به عنوان باکتری غالب (۷۰ درصد) گزارش گردید و ۶۳ درصد جدایه ها نیز قادر به تولید بیوفیلم بودند. در بررسی کیفی تشکیل بیوفیلم با روش ژلوز قرمز کنگو ۹۰ درصد جدایه ها به عنوان بیوفیلم مثبت شناسایی شدند. همچنین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به نورفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید نیز به ترتیب ۸۰ و ۹۳/۳۳ درصد بود (۳۹). در مطالعه منوری و همکاران که بر روی ۱۰۰ جدایه از اعضای خانواده انتروباکتریاسه انجام گرفت، مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، نورفلوکساسین، لووفلوکساسین و اوفلوکساسین به ترتیب ۳۶، ۴۵، ۳۸، ۳۵ و ۳۸ درصد گزارش گردید (۴۰). صدیقی و همکاران در مطالعه بر روی ۱۲۰ جدایه اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک، میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین و لووفلوکساسین را به ترتیب ۱۵، ۱۸ و ۱۷ درصد گزارش کردند (۴۱). رضا زاده و همکاران نشان دادند که ۶۸ درصد از جدایه های اشرشیا کلای نسبت به کینولون ها مقاوم بودند.

همچنین، میزان مقاومت جدایه ها نسبت به آنتی بیوتیکهای سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین و لووفلوکساسین به ترتیب ۵۶ درصد، ۵۵/۵ درصد و ۵۶ درصد بود و بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید ۶۷/۵ درصد گزارش شد (۱۴). به طور کلی بر اساس یافته های حاصل از این مطالعه می توان اعلام کرد که مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین در طی چند سال اخیر روندی رو به رشد داشته است که به علت استفاده فراوان و نابجا از این آنتی بیوتیک می باشد. تمامی آنتی بیوتیکهای اعضای خانواده کوینولون به راحتی در داروخانه ها و بدون نسخه قابل تهیه می باشند و این سهولت دسترسی منجر به استفاده فراوان و بدون تجویز پزشک در کشور شده است که طبیعتا منجر به افزایش مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیکها شده است و در آینده باید منتظر ارائه مقامت بسیار بالاتری نسبت به آنتی بیوتیکهای این خانواده بود.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان دهنده شیوع بالای سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم، سلولز و کورلای و مقاوم به کینولون ها در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری در شهر زاهدان است. پایین بودن سطح بهداشت به علت عدم دسترسی به پزشک، کمبود امکانات و در دسترس نبودن آب سالم یک معضل بسیار جدی در بحث سلامت افراد در این استان محسوب می شود که نیازمند رسیدگی و توجه بیشتر است. همچنین استفاده بی رویه و تجویز نادرست آنتی بیوتیکهای خانواده کینولون ها (بدون آگاهی از وضعیت مقاومت جدایه های در حال گردش در منطقه)، باعث افزایش مقاومت نسبت به اعضای این خانواده شده است. همچنین ریشه کنی باکتریهای تشکیل دهنده بیوفیلم به دلیل ایجاد فنوتایپهای مقاوم بسیار دشوار است و درمانهای ترکیبی یا استفاده از آنتی بیوتیکهای جدید به منظور درمان عفونتهای مرتبط با بیوفیلم کاملا ضروری به نظر می رسد. این مطالعه تنها بر روی تعداد بسیار محدودی از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در یکی از بیمارستانهای شهر زاهدان به انجام رسیده است، بنابراین جهت ارائه نتایج دقیقتر انجام مطالعات جامعتر و گسترده تر در سطح استان سیستان و بلوچستان و تمامی شهرها و روستاها کاملا ضروری به نظر می رسد.

تقدیر تشکر

این مطاله با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان به انجام رسیده است.

REFERENCE

1. Soto SM, Smithson A, Martinez JA, Horcajada JP, Mensa J, J V. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. Journal of Urology. 2007 Jan;177(1):365-8.

2. Rahimi F, Mehmandoost J. Biofilm and curli formation among *Ecshrichia coli* strains isolated from urinary infections in Tehran, 2016. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2018;23(81):9-15.

3. Alanazi MQ, Alqahtani FY, Aleanizy FS. An evaluation of *E. coli* in urinary tract infection in emergency department at KAMC in Riyadh, Saudi Arabia: retrospective study. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2018;17(1):1-7.

4. Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Biofilm formation and frequency of fimbrial genes among *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infection in Zahedan during 2017. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2021;25(91):1-14.

5. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M ,Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nature Reviews Microbiology. 2015;13(5):269-84.

6. Subashchandrabose S, Mobley HL. Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management. 2017;3(4):1-32.

7. Dhakal B, Kulesus R, Mulvey M. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. European Journal of Clinical Investigation. 2008;38(2):2-11.

8. Dadi BR, Abebe T, Zhang L, Mihret A, Abebe W, Amogne W. Distribution of virulence genes and phylogenetics of uropathogenic *Escherichia coli* among urinary tract infection patients in Addis Ababa, Ethiopia. BMC Infectious Diseases. 2020;20(1):1-12.

9. González MJ, Robino L, Iribarnegaray V, Zunino P, Scavone P. Effect of different antibiotics on biofilm produced by uropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with urinary tract infection. Pathogens and Disease. 2017;75(4):1-9.

10. Ong C-LY, Ulett GC, Mabbett AN, Beatson SA, Webb RI, Monaghan W, et al. Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in biofilm formation. Journal of Bacteriology. 2008;190(3):1054-63.

11. Basu S, Mukherjee M. Conjugal transfer of PMQR from uropathogenic *E. coli* under high ciprofloxacin selection pressure generates *gyr*A mutation. Microbial Pathogenesis. 2019;132:26-9.

12. Jones TM, Johnson SW, DiMondi VP, Wilson DT. Focus on JNJ-Q2, a novel fluoroquinolone, for the management of community-acquired bacterial pneumonia and acute bacterial skin and skin structure infections. Infection and Drug Resistance. 2016;9(9):119-28.

13. Habibi M, Azizi O, Asadi Karam MR. The phenotypic and genotypic evaluation of resistance to quinolone antibiotics in clinical *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection of hospitalized patients in Tehran, Iran in 2017. Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2018;6(1):1-10.

14. Rezazadeh M, Baghchesaraei H, Peymani A. Plasmid-mediated quinolone-resistance (*qnr*) genes in clinical isolates of *Escherichia coli* collected from several hospitals of Qazvin and Zanjan Provinces, Iran. Osong Public Health and Research Perspectives. 2016;7(5):307-12.

15. J.F M. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3th ed. Baltimore (Md.): Williams and Wilkins; 2000.

16. 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 Pathogen. 2010;6(7):e1001010.

17. Vareille M, de Sablet T, Hindré T, Martin C, AP G. Nitric Oxide Inhibits Shiga-toxin Synthesis by Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences 2007 Jun;104(24):0199-10204.

18. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2018.

19. Srivastava S, Agarwal J, Mishra B, Srivastava R. Virulence versus fitness determinants in *Escherichia coli* isolated from asymptomatic bacteriuria in healthy nonpregnant women. Indian Journal of Medical Microbiology. 2016;34(1):46-51.

20. Chen XP, Ali L, Wu L-Y, Liu C, Gang CX, Huang QF, et al. Biofilm formation plays a role in the formation of multidrug-resistant *Escherichia coli* toward nutrients in microcosm experiments. Frontiers in Microbiology. 2018;9:367.

21. Brombacher E, Baratto A, Dorel C, Landini P. Gene expression regulation by the curli activator CsgD protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. Journal of Bacteriology. 2006;188(6):2027-37.

22. Ryu JH, Kim H, Frank J, Beuchat L. Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157: H7 as affected by curli production. Letters in Applied Microbiology. 2004;39(4):359-62.

23. Cordeiro MA, Werle CH, Milanez GP, Yano T. Curli fimbria: an *Escherichia coli* adhesin associated with human cystitis. Brazilian Journal of Microbiology. 2016;47(2):414-6.

24. Reichhardt C, Jacobson AN, Maher MC, Uang J, McCrate OA, Eckart M, et al. Congo red interactions with curli-producing *E. coli* and native curli amyloid fibers. PloS One. 2015;10(10):e0140388.

25. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2011;15(4):305-11.

26. Saldaña Z, Xicohtencatl-Cortes J, Avelino F, Phillips A, Kaper J, Puente J, et al. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. Environmental Microbiology. 2009;11(4):992-1006.

27. Nosrati N, Honarmand Jahromy S, Zare Karizi S. Comparison of tissue culture plate, congo red agar and tube methods for evaluation of biofilm formation among uropathogenic *E. coli* isolates. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2017;11(3):49-58.

28. Römling U. Genetic and phenotypic analysis of multicellular behavior in *Salmonella typhimurium*. Methods in Enzymology. 2001;336:48-59.

29. Kothari A, Sagar V. Antibiotic resistance in pathogens causing community-acquired urinary tract infections in India: a multicenter study. Journal of Infection in Developing Countries. 2008;2(05):354-8.

30. Munkhdelger Y, Gunregjav N, Dorjpurev A, Juniichiro N, Sarantuya J. Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia. Journal of Infection in Developing Countries. 2017;11(01):51-7.

31. Fasugba O, Gardner A, Mitchell BG, Mnatzaganian G. Ciprofloxacin resistance in community-and hospital-acquired *Escherichia coli* urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis of observational studies. BMC Infectious Diseases. 2015;15(1):1-16.

32. Nikzad M, Mirnejad R, Babapour E. Evaluation of antibiotic resistance and biofilm formation ability uropathogenic *E. coli* (UPEC) isolated from pregnant women in Karaj. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2021;15(2):195-211.

33. Ponnusamy P, Natarajan V, Sevanan M. In vitro biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* and their antimicrobial susceptibility pattern. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2012;5(3):210-3.

34. Golia S, Hittinahalli V, Karjigi SK, Reddy KM. Correlation between biofilm formation of uropathogenic *Escherichia coli* and its antibiotic resistance pattern. Journal of Evolution of Medical & Dental Sciences. 2012;1(3):166-75.

35. Madani H, Khazaee S, Kanani M, Shahi M. Antibiotic resistance pattern of *E. coli* isolated from urine culture in Imam Reza Hospital Kermanshah-2006. Journal of Kermanshah University of Medical Sciences. 2008;12(38):287-95.

36. Sharifi A, Khoramrooz S, Khosravani S, Yazdanpanah Yazdanpanah M, Gharibpour F, Malekhoseini Malekhoseini A, et al. Antimicrobial resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection (UTI) in Yasuj city during 1391-1392. Armaghane Danesh. 2014;19(4):337-46.

37. Amini F, Vaziri S, Karimpour H, Hasani S, Mohamadi S, Azizi M. Antibiotic resistance pattern of urinary tract infection pathogens in children of Kermanshah in 2015. Razi Journal of Medical Sciences 2017;24(155):20-7.

38. Mahdavi A, Nahaei MR, Akhi MT, Nahaei M, Dibavar MA. Antibiotic resistance pattern against fluoroquinolones among *Escherichia coli* isolated from ICU and out-patient clinic admitted patients with urinary tract infection. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences. 2009;31(3):91-6.

39. Subramanian P, Shanmugam N, Sivaraman U, Kumar S, Selvaraj S. Antiobiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India. Australasian Medical Journal. 2012;5(7):344.

40. Monavari A, Nourbakhsh F, Yalfani R. Alterations of *gyr*A in *Enterobacteriaceae* isolated of urinary tract infection resistance to quinolones antibiotics. Medical Sciences. 2017;27(2):133-7.

41. Sedighi I, Arabestani MR, Rahimbakhsh A, Karimitabar Z, Alikhani MY. Dissemination of extended-spectrum β-lactamases and quinolone resistance genes among clinical isolates of uropathogenic *Escherichia coli* in children. Jundishapur Journal of Microbiology. 2015;8(7):e19184.