

مقاله پژوهشی

بررسی ارتباط ژن‌های ویبرولانس *flu* و *csgA* با توانایی تشکیل بیوفیلیم در جدایه‌های بالینی باکتری اشرشیاکلی یوروپاتوژن

فائزه مقدس کاسانی^۱، علی صالح زاده^{۱*}، امیر جلالی^۲

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۷/۱۰

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۶/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: عوامل مختلفی در قابلیت ایجاد عفونت توسط باکتری اشرشیاکلی یوروپاتوژن در مجاری ادراری انسان وجود دارد که در میان آن‌ها توانایی تشکیل بیوفیلیم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط ژن‌های ویبرولان *flu* و *csgA* با توانایی تشکیل بیوفیلیم در این باکتری بود. **مواد و روش‌ها:** ۴۵ جدایه باکتری اشرشیاکلی یوروپاتوژن از بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری در شهر رشت جمع‌آوری و پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی و میکروپشناسی استاندارد، حضور ژن‌های ویبرولان *flu* و *csgA* در آن‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) بررسی شد. از تست آنتی‌بیوگرام برای بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها و ارتباط آن با توانایی تولید بیوفیلیم استفاده گردید.

نتایج: بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و تتراسیکلین بود. بر اساس نتایج PCR، ۶۰٪ از جدایه‌ها دارای ژن *flu* ۸۲٪ دارای ژن *csgA* و ۵۵/۵٪ حاوی هر دو ژن بودند. چهار جدایه باقابلیت پائین تشکیل بیوفیلیم، ۱۰ جدایه باقابلیت تشکیل بیوفیلیم قوی و ۱۱ جدایه باقدرت تشکیل بیوفیلیم متوسط هر دو ژن *flu* و *csgA* را داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان‌دهنده ارتباط معنی‌دار بین حضور ژن‌های *flu* و *csgA* باقابلیت تشکیل بیوفیلیم توسط جدایه‌های مورد مطالعه است. بنابراین هدف قرار دادن این ژن‌ها می‌تواند به‌عنوان یک راه مناسب برای درمان عفونت‌های ادراری مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. از طرف دیگر با توجه به مقاومت بالای این جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و تتراسیکلین، استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری پیشنهاد نمی‌شود.

کلمات کلیدی: اشرشیاکلی یوروپاتوژن، بیوفیلیم، عفونت مجاری ادراری، *flu*، *csgA*

مقدمه

به‌موقع آن می‌تواند عوارض شدیدی را به دنبال داشته باشد، متفاوت است. در ۸۰ درصد از عفونت‌های ادراری، باکتری اشرشیاکلی عامل اصلی ایجاد بیماری است (۱). اشرشیاکلی نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه و یکی از اجزای فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان و حیوانات خونگرم است که بعضی از سویه‌های آن با به دست آوردن ژن‌های ویبرولانس قابلیت بیماری‌زایی پیدا کرده‌اند. سویه‌های بیماری‌زای باکتری اشرشیاکلی بر اساس قابلیت بیماری‌زایی و نوع علائم بالینی

عفونت دستگاه ادراری (Urinary tract infection) یکی شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی در گروه‌های سنی مختلف انسان است که سالانه میلیون‌ها نفر در سراسر جهان به آن مبتلا می‌شوند. شدت بیماری از باکتریوری بدون علامت تا سیستیت حاد و در موارد شدیدتر پیلونفریت که عدم تشخیص صحیح و درمان

*نویسنده مسئول: علی صالح‌زاده، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی،

Email: salehzadeh@iaurasht.ac.ir

رشت، ایران

https://orcid.org/0000-0003-4238-0999

طبیعی مایعات بدن مانند خون و ادرار می‌شود، یک مرحله ضروری در آغاز کلونیزاسیون باکتری در سطوح مخاطی میزبان و مقدمه عفونت تهاجمی محسوب می‌شود (۱۱). مجاری ادراری به شکل طبیعی یک محیط استریل هستند که باکتری‌ها قادر نیستند به راحتی در اپیتلیوم آن‌ها کلونیزه شوند. باین حال، سویه‌های *اشرشیاکلی* یوروپاتوژن می‌توانند به وسیله ساختارهای چسبنده سطحی مانند پیلی S، چسبنده‌های خانواده Dr، پیلی P و فیمبریای کورلی (*Curlifimberia*)، با باقی ماندن در این مجاری باعث ایجاد عفونت در آن‌ها گردند.

فیمبریای کورلی که اولین بار در باکتری *اشرشیاکلی* شناسایی شد، یک چسبنده سطحی با ساختار پروتئینی است که با اتصال به پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی مانند فیبرونکتین، لامینین و پلازمینوزن (۱۲، ۱۳) امکان اتصال باکتری به سلول‌های مختلف انسان را فراهم می‌کند. بنابراین وجود این ساختار نقش مهمی در تشکیل بیوفیلم توسط باکتری دارد. Luna-Pineda و همکاران (۲۰۱۹) با آلوده کردن موش‌های C57BL/6 با دو گروه از سویه‌های UPEC که یکی دارای قابلیت تولید فیمبریای کورلی و دیگری فاقد این قابلیت بودند، نشان دادند که حضور فیمبریای کورلی در سویه‌های *اشرشیاکلی* یوروپاتوژن نقش مهمی در استقرار و تکثیر آن‌ها در مجاری ادراری میزبان دارد (۱۴). فیمبریای کورلی از دو زیر واحد بزرگ و کوچک به نام کورلین تشکیل شده که به ترتیب توسط ژن‌های *csgA* و *csgB* کد می‌شوند. تنظیم بیان ژن‌های فیمبریای کورلی بسیار پیچیده و تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی است. Carter و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که میزان بیان ژن‌های کد کننده اجزای فیمبریای کورلی در باکتری *اشرشیاکلی* O157:H7 سویه EDL933 افزایش پیدا می‌کند (۱۵). آنتی‌ژن ۴۳ (Ag43) یک پروتئین خارجی در غشاء اکثر سویه‌های باکتری *اشرشیاکلی* است که توسط ژن *flu* کد می‌شود. این پروتئین اتصال باکتری‌ها به یکدیگر را تسهیل می‌کند که نتیجه آن رشد سه‌بعدی بیوفیلم است. چنانچه گونه‌های مختلف باکتری‌ها قادر به بیان این ژن باشند، امکان تشکیل یک بیوفیلم مرکب بین این گونه‌ها نیز فراهم خواهد شد. در مطالعه‌ای که Wallecha و همکاران در سال ۲۰۱۴ (۱۶) بر روی ژن *flu* در باکتری *اشرشیاکلی* انجام دادند، نشان داده شد که آنتی‌ژن ۴۳ نقش مهمی در اتصال سلول‌های باکتری به یکدیگر دارد. همچنین تقدسی و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی‌های خود وجود

ظاهر شده در میزبان به چند فرم بیماری‌زا تقسیم می‌شوند که در بین آن‌ها، سویه‌های یوروپاتوژن (*UroPathogenic Escherichia coli* (UPEC) عامل ایجاد عفونت در دستگاه ادراری هستند. این سویه‌ها می‌توانند با تشکیل اجتماعات پرسلولی به نام بیوفیلم به راحتی در سطوح مجاری ادراری و دیواره مثانه تثبیت شوند (۲، ۳). با تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها، میزان محافظت از آن‌ها در برابر پاسخ ایمنی میزبان و همچنین داروهای ضد میکروبی به طور قابل توجهی افزایش یافته و به همان نسبت درمان بیماری سخت‌تر می‌شود. برای بیماران مبتلا به عفونت‌های دستگاه ادراری ممکن است تجویز سفالوسپورین‌های نسل سوم، کاربامپنم‌ها و آمینوگلیکوزیدها در نظر گرفته شود (۴). باکتری‌های درون بیوفیلم نزدیک به یکدیگر قرار دارند که این نزدیکی باعث تسهیل در مبادله مواد ژنتیکی مانند پلاسمیدهای مقاومت به عوامل ضد میکروبی و ترانسپوزون‌ها بین آن‌ها می‌شود (۵، ۶). Singh و همکاران (۲۰۱۷) با انجام مطالعات *in vitro* بر روی قابلیت تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌هایی از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان دادند که فاکتورهای مختلفی در قابلیت تشکیل بیوفیلم توسط این باکتری نقش دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به رشد باکتری‌ها بر روی محیط کشت جامد و میزان غنای محیط از نظر مواد غذایی اشاره کرد (۷). تولید بیشتر بیوفیلم در محیط کشت جامد احتمالاً به دلیل بیان بیشتر پروتئین‌های سطحی مورد نیاز برای اتصال به محیط اطراف توسط سلول‌های باکتری است. وجود پروتئین‌های غنی از اسیدآمینوهای لوسین، پرولین، سرین و آسپاراتات که وجودشان برای تولید آدهسین‌هایی مانند پروتئین‌های اتصال به فیبرونکتین و کلامپینگ فاکتورها ضروری است و همچنین لیپیدهایی مانند کولین و اسفنگوزین، می‌تواند نقش مهمی در افزایش تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته باشد. مطالعات انجام شده توسط Jo و همکاران (۲۰۱۷) بر روی باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و همچنین مطالعاتی که Floyd و همکاران (۲۰۱۵) بر روی *اشرشیاکلی* انجام دادند، مشخص کرد که حضور اکسیژن نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌های شرکت کننده در تشکیل بیوفیلم دارد (۸، ۹). Allison و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که در غیاب اکسیژن، میزان تشکیل بیوفیلم در سویه‌های باکتری *اشرشیاکلی* تا ۹۶٪ کاهش خواهد داشت (۱۰). به طور کلی، اتصال باکتری به ساختارهای میزبان که مانع از حذف آن توسط جریان

آلمان)، با سه بار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. دیسک‌های مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین (۳۰ میلی‌گرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میلی‌گرم)، ایمی‌پنم (۱۰ میلی‌گرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میلی‌گرم)، جنتامایسین (۱۰ میلی‌گرم)، پیرپراسیلین (۱۰۰ میلی‌گرم) و سفتریاکسین (۳۰ میلی‌گرم) از شرکت پادتن طب خریداری گردید. پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی طبق استانداردهای مک‌فارلند و انتقال آن بر روی پلیت حاوی محیط مولر هینتون آگار، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با استفاده از پنس استریل و به‌طور یکنواخت بر روی سطح پلیت قرار گرفته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. در ادامه قطر هاله عدم رشد باکتری اندازه‌گیری و نتیجه بر اساس موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) (2017) برای آنتی‌بیوتیک‌ها به‌صورت مقاوم، بینابینی و حساس گزارش گردید (۱۸).

بررسی تشکیل بیوفیلم با روش رنگ‌آمیزی کریستال

ویوله

سویه‌های باکتری بر روی محیط کشت LB براث (lysogeny broth) کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند (۱۹). پس از رشد، سلول‌های باکتری تحت تأثیر نیروی 3000 g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب به‌دست آمده دو بار با بافر نمکی فسفات شستشو و سلول‌ها مجدداً در محیط کشت LB تازه به حالت سوسپانسیون درآمد. با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و سوسپانسیون باکتریایی با OD برابر 0.06 که معادل با غلظت 10^8 CFU/mL است تهیه گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری به چاهک‌های جداگانه یک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه-ای با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگاه‌داری شدند. آزمایش برای هر سویه سه بار تکرار و از یک محیط کشت فاقد باکتری به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. پس از رشد باکتری‌ها، به‌منظور تعیین میزان تشکیل بیوفیلم، میزان چسبندگی کلنی‌ها به سطوح پلی‌استیرنی ته چاهک‌ها با استفاده از روش رنگ‌آمیزی کریستال ویوله و اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید. به این منظور، به‌گونه‌ای که به لایه بیوفیلم تشکیل‌شده آسیبی وارد نشود، پس از خارج کردن دقیق محیط کشت، هر چاهک سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد.

یک ارتباط معنی‌دار بین افزایش بیان ژن *flu* و توانایی باکتری اشرشیاکلی در تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح غیرزنده را گزارش کردند (۱۷).

با توجه به شیوع سالیانه بالای عفونت‌های ادراری در جهان که هزینه درمان بالایی را به جوامع تحمیل می‌کند، شناخت ویژگی‌های ژنتیکی و عوامل میزبان که تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های یوروپاتوزن باکتری اشرشیاکلی را تسهیل می‌کنند از یک سو و شناسایی دقیق خصوصیات بیماری‌زایی عوامل مؤثر در ایجاد بیماری از سوی دیگر، می‌تواند نقش مهم و مؤثری در توسعه استراتژی‌های بهتر برای مبارزه با شکل‌گیری بیوفیلم‌ها و درمان مؤثرتر عفونت داشته باشد. به همین منظور در مطالعه حاضر به بررسی ارتباط ژن‌های ویروانس *flu* و *csgA* با توانایی تشکیل بیوفیلم در باکتری‌های اشرشیاکلی جداشده از افراد مبتلا به عفونت ادراری در شهر رشت پرداخته‌ایم.

مواد و روش‌ها

تهیه سویه‌های باکتری

جدایه‌های باکتری اشرشیاکلی مورد مطالعه در این تحقیق، از نمونه ادرار ۲۵۰ بیمار مبتلا به عفونت ادراری که در بازه زمانی مرداد تا آذرماه سال ۱۳۹۷ به سه آزمایشگاه رازی، دکتر آشتیانی و دکتر فدایی شهر رشت مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها به شکل تصادفی از بیماران زن و مرد با محدوده سنی ۲ ماهه تا ۷۹ ساله تهیه شد. برای شناسایی و تأیید جدایه‌ها از روش‌های معمول میکروبی‌شناسی مانند رنگ‌آمیزی گرم و تکنیک‌های استاندارد بیوشیمیایی مانند آزمایش‌های کاتالاز، اکسیداز، ایندول، متیل قرمز، حرکت، ووگس پروسکوئر (vp) و سیمون سترات آگار استفاده شد. در همه بررسی‌ها از سویه استاندارد اشرشیاکلی ATCC25922 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. چنانچه مقدار باکتری موجود در ادرار برابر با 10^5 CFU/mL باشد، فرد مبتلا به عفونت ادراری است. نمونه‌های تأیید شده برای بررسی‌های بعدی در محیط کشت TSB حاوی ۱۰ درصد گلیسرول و دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگاه‌داری شدند.

آزمون تعیین حساسیت به آنتی‌بیوتیک

پس از تأیید هویت باکتری‌های یوروپاتوزن، حساسیت آن‌ها نسبت به ۷ آنتی‌بیوتیک متداول به روش انتشار از دیسک (کربی-بائر) بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک)،

کیفیت بر روی ژل آگارز ۱ درصد، DNA استخراج شده در آب مقطر دیونیزه و دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

بررسی وجود ژن های ویروالانس *flu* و *csgA* در سویه های مورد بررسی

برای بررسی ارتباط بین قابلیت تشکیل بیوفیلیم توسط جدایه های یوروپاتوژن باکتری *اشرشیاکلی* و وجود ژن های ویروالانس *flu* و *csgA* در آن ها، از روش واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) استفاده گردید. توالی آغازگرهای مورد استفاده و طول قطعه ای که توسط آن ها تکثیر می شود در جدول ۱ نشان داده شده است. برای هر یک از دو ژن مورد نظر، واکنش PCR با استفاده از ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر، دو میکرولیتر DNA استخراج شده، ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس، یک میکرولیتر از هر آغازگر و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر گرادیان دار (شرکت اپندورف) و طبق چرخه های دمایی و زمانی جدول ۲ انجام شد. در پایان برای شناسایی محصولات، از روش رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده گردید.

میکروپلیت ها به مدت ۳۰ دقیقه در گرمخانه ای با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد خشک شدند. در ادامه به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محلول کریستال ویوله ۱ درصد (وزنی/حجمی) اضافه و پس از ۲۰ دقیقه برای حذف رنگ اضافه، چاهک ها دو بار با آب مقطر استریل شستشو و میکروپلیت ها به صورت برعکس نگهداری شده تا خشک شوند. میزان تشکیل بیوفیلیم در هر چاهک با اندازه گیری جذب نور در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید. در صورتی که جذب نوری کمتر از ۰/۳۵ باشد شدت تشکیل بیوفیلیم ضعیف، بین ۰/۳۵ تا ۰/۴۵ شدت تشکیل متوسط و مقادیر جذب بالاتر از ۰/۴۵ نشان دهنده قدرت بالای تشکیل بیوفیلیم در سویه های باکتری *اشرشیاکلی* است.

استخراج DNA

پس از خارج کردن سویه های ذخیره شده از فریزر و گرفتن کلونی تک بر روی محیط EMB، باکتری ها به محیط LB تلقیح گردید. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد، استخراج DNA از باکتری های رشد کرده به وسیله کیت شرکت سیناژن و طبق دستورالعمل آن انجام شد. پس از بررسی

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده جهت بررسی حضور ژن های *csgA* و *flu* در سویه های مورد مطالعه

ژن	توالی آغازگر (۵' → ۳')	اندازه محصول	منابع
<i>csgA</i>	F: TGGCAGGTGTTGTTTCCTCAGT R: GTCAGAGTTACGGGCATCAGTTT	300 bp	۲۰
<i>flu (agn43)</i>	F: TTCCGGGAAGACGGTGAA R: TTCTGGGTGAGTGTGGTGTG	350 pb	۲۱

جدول ۲- برنامه زمانی و دمایی واکنش زنجیره ای پلی مرز

مراحل PCR	دما بر حسب درجه سانتی گراد	زمان	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۵°C	۴ دقیقه	
واسرشت شدن	۹۴°C	۳۰ ثانیه	۳۰
اتصال	۶۰°C	۴۵ ثانیه	
گسترش	۷۲°C	۱ دقیقه	
گسترش نهایی	۷۲°C	۸ دقیقه	

تجزیه و تحلیل آماری

سیمون سیترا، اکسیداز و اوره آز منفی بود. به این ترتیب و بر اساس نتایج به دست آمده هویت باکتری ها به عنوان اشرشیاکلی مورد تأیید قرار گرفت.

بررسی الگوی حساسیت به آنتی بیوتیک ها

نتایج بررسی الگوی حساسیت و مقاومت ۴۵ جدایه باکتری اشرشیاکلی یوروپاتوزن نسبت به ۷ آنتی بیوتیک متداول تتراسایکلین، کلرامفنیکل، ایمی پنم، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، پپراسیلین و سفتریاکسین نشان داد که تعدادی از جدایه ها نسبت به سه آنتی بیوتیک تتراسایکلین (۶۰ درصد)، کلرامفنیکل (۳۱/۱ درصد) و سفتریاکسین (۲۸/۹ درصد) مقاوم بوده و نسبت به سایر آنتی بیوتیک ها کاملاً حساس هستند.

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم و ارتباط آن با حضور

ژن های ویروالانس *flu* و *csgA*

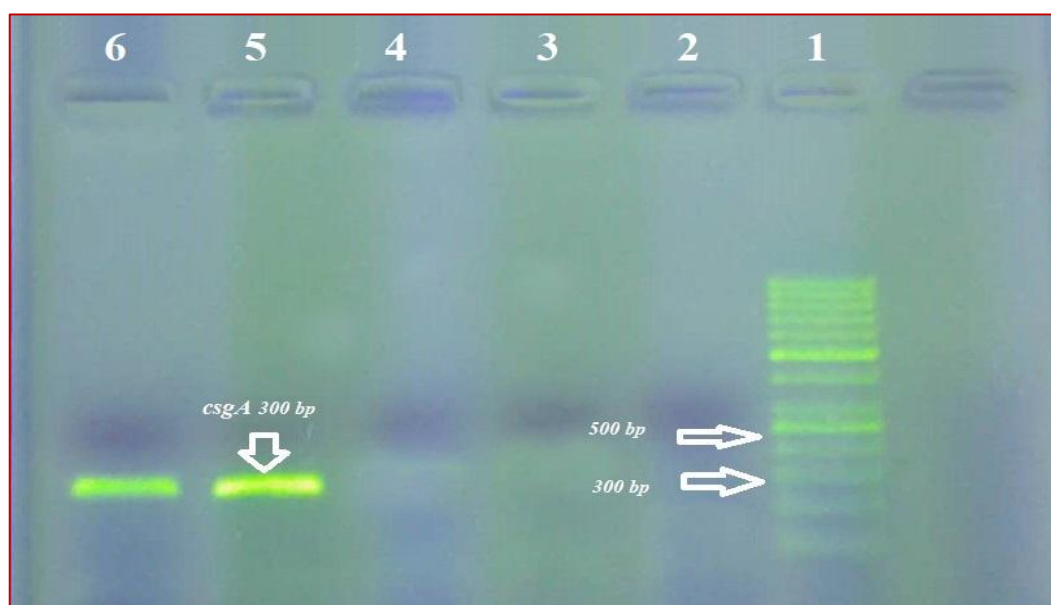
نتیجه آزمون اندازه گیری قابلیت تولید بیوفیلم، نشان داد که از مجموع ۴۵ سویه مورد مطالعه، ۱۶ جدایه (۳۵/۵ درصد) دارای قابلیت چسبندگی بالا، ۱۹ جدایه (۴۲/۲ درصد) با توانایی چسبندگی متوسط و ۱۰ جدایه (۲۲/۲ درصد) دارای قابلیت چسبندگی پائین هستند. حضور ژن های ویروالانس *flu* و *csgA* در سویه های مورد مطالعه با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز مورد بررسی قرار گرفت (شکل های ۱ و ۲). نتیجه آزمون

تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ انجام شد. برای محاسبه مقادیر P از آزمون مجذور کای استفاده و مقادیر کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنادار تعریف شد.

نتایج

مطالعه بر روی ۴۵ جدایه باکتری اشرشیاکلی تهیه شده از بیماران مبتلابه عفونت مجاری ادراری در شهر رشت انجام شد. محدوده سنی بیماران از کودک ۲ ماهه تا مرد ۷۹ ساله متغیر بود. با توجه به میزان مراجعه مردان و زنان به مراکز مورد نظر، ۳۳ جدایه از زنان و ۷ جدایه از مردان به دست آمد که این نسبت نشان دهنده شایع بودن عفونت ادراری در زنان است.

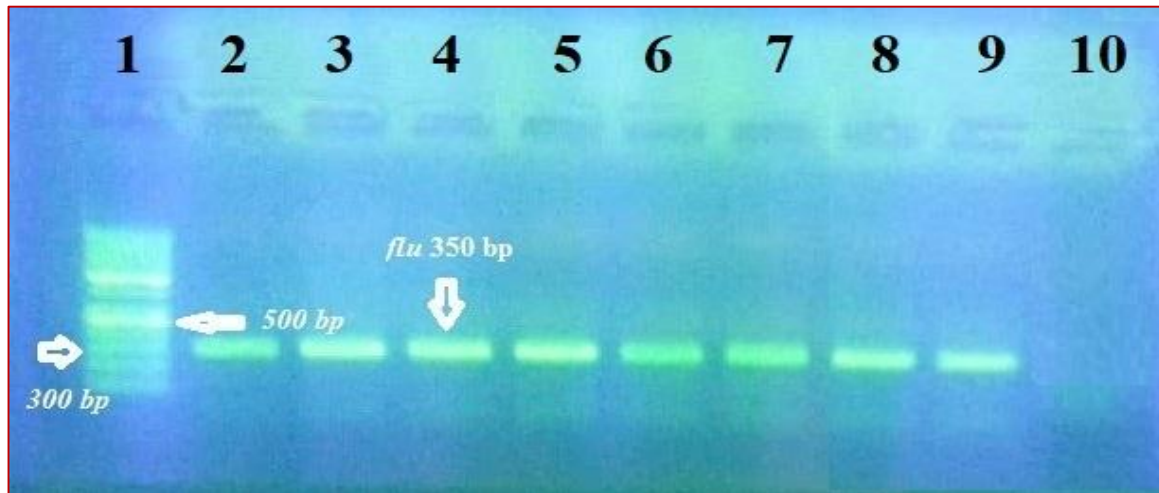
بررسی هویت باکتری های جدا شده با روش های معمول میکروبی شناسی و تکنیک های استاندارد بیوشیمیایی نشان داد که همه ۴۵ جدایه باسیل های گرم منفی که در محیط TSI به صورت اسید بر اسید A/A (زرد/زرد) رشد کرده و H_2S منفی و گاز مثبت هستند. همچنین این جدایه ها در محیط SIM، دارای تست حرکت و ایندول مثبت و H_2S منفی بودند. برای همه جدایه ها، تست های MR و کاتالاز مثبت و تست های VP،



شکل ۱- نتیجه واکنش زنجیره ای پلیمرز انجام شده برای شناسایی ژن *csgA* در ایزوله های باکتری اشرشیاکلی یوروپاتوزن. ستون شماره ۱ نشانگر اندازه ۱۰۰bp، ستون شماره ۲ کنترل منفی (آب مقطر استریل)، ستون های شماره ۳ و ۴ ایزوله های فاقد ژن *csgA*، ستون ۵ یک ایزوله باکتری اشرشیاکلی یوروپاتوزن حاوی ژن *csgA* و ستون ۶ کنترل مثبت (سویه استاندارد ATCC 25922).

مقاومت در باکتری‌های بیماری‌زا شده است، چالش جدی و مهمی را در مقابله با انواع عفونت‌ها ایجاد کرده است (۲۰).
اشریشیاکلی یوروپاتوژن (UPEC) به‌عنوان یکی از عوامل اصلی

نشان داد که ژن *csgA* در ۳۸ و ژن *flu* در ۲۷ سویه وجود دارند. در جدول ۳ ارتباط بین سویه‌های حاوی این ژن‌ها و توانایی تشکیل بیوفیلم نشان داده شده است.



شکل ۲- نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام‌شده برای شناسایی ژن *flu* در ایزوله‌های باکتری اشریشیاکلی یوروپاتوژن. ستون شماره ۱ نشانگر اندازه 100bp، ستون شماره ۲ کنترل مثبت (سویه استاندارد ATCC 25922)، ستون‌های شماره ۳ تا ۹ ایزوله‌های حاوی ژن *flu*، ستون ۱۰ کنترل منفی (آب مقطر استریل)

جدول ۳- ارتباط بین وجود ژن‌های ویروالانس *flu* و *csgA* و قابلیت تشکیل بیوفیلم در سویه‌های اشریشیاکلی مورد مطالعه در سطح معنی‌دار ۰/۰۵

تعداد جدایه‌های فاقد هر دو ژن	تعداد جدایه‌های دارای هر دو ژن	ژن <i>flu</i>		ژن <i>csgA</i>		قابلیت تشکیل بیوفیلم
		تعداد جدایه‌های فاقد ژن	تعداد جدایه‌های دارای ژن	تعداد جدایه‌های فاقد ژن	تعداد* جدایه‌های دارای ژن	
۱	۱۰	۴	۱۲	۳	۱۳	قوی
۱	۱۱	۷	۱۲	۲	۱۷	متوسط
۲	۴	۷	۳	۲	۸	ضعیف
۴	۲۵	۱۸	۲۷	۷	۳۸	مجموع

* تعداد کل جدایه‌ها: ۴۵

بحث

ایجادکننده عفونت مجاری ادراری (UTI) شناخته می‌شود که با ایجاد بیوفیلم در برابر سیستم‌های دفاعی میزبان و همچنین روش‌های درمان بیماری مقاومت می‌کند. ژن‌های مختلفی در قابلیت تشکیل بیوفیلم در سویه‌های مختلف باکتری اشریشیاکلی شرکت دارند. با توجه به وجود تفاوت‌های ژنتیکی بین سویه‌های

عفونت مجاری ادراری، دومین عفونت شایع باکتریایی پس از عفونت مجاری تنفسی است. باکتری اشریشیاکلی، اصلی‌ترین عامل ایجاد این نوع عفونت است که برای مقابله با آن از درمان آنتی‌بیوتیکی استفاده می‌شود. با این حال استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف که منجر به پیدایش و انتشار ژن‌های

یوروپاتوزن به دست آمده از ۱۲۳ بیمار مبتلا به عفونت ادراری را بررسی و مقاومت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین را ۷۳/۹۸ درصد گزارش کردند (۲۴). میزان بالای مقاومت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین دلایل مختلفی دارد. یکی از دلایل این مقاومت بالا، استفاده بیش از حد از این آنتی‌بیوتیک در درمان عفونت‌های روده‌ای انسان است که منجر به پیدایش ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین در باکتری‌ها و انتقال این ژن‌ها از طریق پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها به باکتری‌های دیگر است. نسرین بهمنی و همکاران (۲۰۲۰) با مطالعه بر روی سویه‌های اشرشیاکلی یوروپاتوزن به دست آمده از بیماران بیمارستانی و غیر بیمارستانی شهر سنج، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای این سویه‌ها را نسبت به آمپی‌سیلین و نالیدیستیک اسید (بیشتر از ۶۰ درصد) و بیشترین حساسیت را نسبت به مروپنم (۹۳/۳ درصد) و ایمی‌پنم (۸۰ درصد) گزارش کردند (۲۵). در مطالعه‌ای دیگر که توسط Rashmi و همکاران (۲۰۱۹) در بیمارستان و مرکز تحقیقات دانشگاه کالج پزشکی Shri BM ایالت کارناتاکا، هند انجام شد (۲۶)، میزان مقاومت جدایه‌های اشرشیاکلی یوروپاتوزن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم و جنتامایسین به ترتیب ۱۱/۶ و ۹۴/۲ درصد گزارش گردید که تأیید کننده تفاوت در الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری به دلیل اختلاف در منطقه جغرافیایی است.

در بررسی توانایی تولید بیوفیلم توسط جدایه‌های مورد بررسی، به ترتیب ۱۶ جدایه (۳۵/۵ درصد) قدرت بالا، ۱۹ جدایه (۴۲/۲ درصد) قابلیت متوسط و ۱۰ جدایه (۲۲/۲ درصد) دارای قابلیت پائین در تولید بیوفیلم بودند. در حالی که مطالعه حاضر نشان می‌دهد همه جدایه‌های مورد مطالعه دارای قابلیت تشکیل بیوفیلم هستند، در مطالعه‌ای که تاجبخش و همکاران (۲۰۱۶) بر روی ۱۳۰ سویه اشرشیاکلی یوروپاتوزن به منظور بررسی قابلیت تشکیل بیوفیلم توسط این سویه‌ها و ارتباط آن با مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج انجام دادند، مشخص شد که ۶۱/۵۳ درصد از سویه‌ها دارای قابلیت تشکیل بیوفیلم هستند. همچنین طبق گزارش آن‌ها که با مطالعه حاضر همخوانی دارد، یک ارتباط معنی‌دار بین این قابلیت و مقاومت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و ایجاد عفونت مزمن توسط سویه‌های اشرشیاکلی یوروپاتوزن وجود دارد (۲۷). در بررسی انجام شده توسط Amadu و همکاران (۲۰۱۹) در کشور نیجریه، بر روی نمونه‌های ادرار به دست آمده از بیماران نیز ارتباط بین قابلیت

مختلف اشرشیاکلی در نقاط مختلف دنیا یا حتی یک کشور یا یک منطقه، آگاهی از الگوی مقاومت این سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، شناسایی عوامل ژنتیکی مؤثر در شکل‌گیری بیوفیلم در گروه‌های مختلف اشرشیاکلی، می‌تواند نقش مهمی در انتخاب روش درمانی مناسب علیه عامل بیماری داشته باشد. به همین منظور در مطالعه حاضر که برای اولین بار در سطح شهر رشت صورت گرفته است، ۴۵ جدایه بالینی باکتری اشرشیاکلی یوروپاتوزن از ۲۵۰ بیمار مراجعه کننده به سه آزمایشگاه تشخیص طبی جداسازی و پس از اینکه الگوی حساسیت و مقاومت آن‌ها در برابر ۷ آنتی‌بیوتیک متداول بیمارستانی تعیین گردید، وجود دو ژن ویروانس *flu* و *csGA* و ارتباط آن‌ها با توانایی تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های مورد مطالعه بررسی شد.

نتایج به دست آمده از آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی، نشان داد که بیشترین میزان مقاومت در سویه‌های مورد مطالعه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین (۶۰ درصد)، کلرامفنیکل (۳۱/۱ درصد) و سفتریاکسین (۲۸/۹ درصد) است. در مقابل همه سویه‌های اشرشیاکلی جدا شده، به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و پیراسیلین کاملاً حساس (۱۰۰ درصد) بودند. برخلاف مشاهدات به دست آمده در مطالعه حاضر، نتایج Potrykus و همکاران (۲۰۰۱)، نشان دهنده درصد بالای حساسیت بین سویه‌های اشرشیاکلی نسبت به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل بود (۲۱). به نظر می‌رسد این عدم تطابق به دلیل تفاوت در محل جغرافیایی باشد که اهمیت پایش‌های منطقه‌ای را آشکار می‌کند. در مطالعه دیگری که توسط حقیقت پناه و مجتهدی (۲۰۱۹) بر روی سویه‌های اشرشیاکلی یوروپاتوزن به دست آمده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌های شهر رشت صورت گرفت، سویه‌های مورد مطالعه بیشترین مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۷۸/۳ درصد) و نالیدیستیک اسید (۷۴/۴ درصد) و در مقابل بیشترین حساسیت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نیتروفورانوئین (۹۶/۱ درصد) و ایمی‌پنم (۹۲/۲ درصد) داشتند (۲۲). ملاعباس زاده و همکاران (۲۰۱۳) میزان مقاومت سویه‌های اشرشیاکلی یوروپاتوزن نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین را ۸۰/۹۷ درصد گزارش کردند که با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد (۲۳). همچنین در گزارشی دیگر، ممتاز و همکاران در سال ۲۰۱۳، میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های اشرشیاکلی

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در تست آنتی بیوگرام، استفاده از آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین و کلرامفنیکل به عنوان یک درمان مناسب برای افراد مبتلا به عفونت ادراری در شهر رشت پیشنهاد نمی‌شود. همچنین وجود ارتباط معنی دار بین شیوع بالای ژن-های *flu* و *csGA* با تولید بیوفیلیم در سویه‌های *اشرشیاکلی* مورد مطالعه، می‌توان این ژن‌ها را به عنوان یک هدف مناسب برای مداخلات درمانی مورد بررسی بیشتر قرار داد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل رساله دوره کارشناسی ارشد نویسنده اول است که با استفاده از پژوهانه نویسنده مسئول انجام شده و هیچ گونه حامی مالی نداشته است. همچنین نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسئولین فنی آزمایشگاه‌های رازی، دکتر آشتیانی و دکتر فدایی شهر رشت که در تهیه نمونه‌های باکتری همکاری داشتند، ابراز می‌دارند.

در تمام مراحل تحقیق، ملاحظات اخلاقی مطابق با بیانیه کمیته اخلاق هلسینکی (UOZ-GR-9517-13) رعایت شده است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

تشکیل بیوفیلیم و مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌های سفنازیدیم و آموکسی سیلین مورد تأیید قرار گرفت (۲۸). در پژوهش Katongole و همکاران در کشور اوگاندا، ۶۲/۵ درصد از ۲۰۰ ایزوله *اشرشیاکلی* یوروباتوزن مورد مطالعه دارای قابلیت تشکیل بیوفیلیم و ۷۸ درصد از آن‌ها نسبت به چند آنتی بیوتیک مقاوم بودند (۲۹). این نتایج نیز تأیید کننده ارتباط بین قابلیت تشکیل بیوفیلیم و مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در سویه‌های *اشرشیاکلی* یوروباتوزن است.

در مطالعات مولکولی به منظور بررسی وجود ژن‌های *flu* و *csGA* در سویه‌های مورد مطالعه، از تعداد کل نمونه‌ها، ۲۷ مورد (۶۰ درصد) دارای ژن *flu*؛ ۳۸ مورد (۸۲ درصد) دارای ژن *csGA* و ۲۵ جدایه (۵۵/۵ درصد) حاوی هر دو ژن بودند. در این بین، تنها در ۴ جدایه با قابلیت پائین تشکیل بیوفیلیم، هر دو ژن *flu* و *csGA* وجود داشت، در حالی که ۱۰ جدایه با قابلیت تشکیل بیوفیلیم قوی و ۱۱ جدایه با قدرت تشکیل بیوفیلیم متوسط هر دو ژن را داشتند. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد که وجود هر دو ژن می‌تواند در تولید بیوفیلیم نقش مؤثر داشته باشند. نتایج تحقیق Chen و همکاران (۲۰۱۰) نیز ارتباط هر دو ژن *flu* و *csGA* با تولید بیوفیلیم را اثبات کرده که با تحقیق حاضر هم خوانی دارد (۳۰).

References

- Kennedy EH, Greene MT, Saint S. Estimating hospital costs of catheter-associated urinary tract infection. *J Hosp Med*. 2013; 8:519–522.
- Rosen DA, Hooton TM, Stamm WE, Humphrey PA, Hultgren SJ. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med*. 2007; 4:e329.
- Schaffer JN, Norsworthy AN, Sun TT, Pearson MM. *Proteus mirabilis* fimbriae- and urease-dependent clusters assemble in an extracellular niche to initiate bladder stone formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113:4494–4499.
- Negus M, Phillips C, Hindley R. Recurrent urinary tract infections: A critical review of the currently available treatment options. *Obstet Gynaecol*, 2020; 22(2), 115–121.
- Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8:623–633.
- Aminov RI. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front Microbiol*. 2011; 2:158.
- Singh AK, Prakash P, Achra A, Singh GP, Das A, Singh RK. Standardization and Classification of In vitro Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Glob Infect Dis*. 2017; 9(3):93-101.
- Jo J, Cortez KL, Cornell WC, Price-Whelan A, Dietrich LE. An orphan *cbb₃*-type cytochrome oxidase subunit supports *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth and virulence. *Elife*. 2017; 6:30205.



9. Floyd KA, Moore JL, Eberly AR, Good JA, Shaffer CL, Zaver H, et al. Adhesive fiber stratification in uropathogenic *Escherichia coli* biofilms unveils oxygen-mediated control of type 1 pili. *PLoS Pathog.* 2015; 11:e1004697.
10. Eberly AR, Floyd KA, Beebout CJ, Colling SJ, Fitzgerald MJ, Stratton CW, et al. Biofilm Formation by Uropathogenic *Escherichia coli* Is Favored under Oxygen Conditions That Mimic the Bladder Environment. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(10). E2077.
11. Campos LC, Franzolin MR, Trabulsi LR. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2004; 99(2):545-552.
12. Ben Nasr A, Olsen A, Sjobring U, Muller-Esterl W, Bjorck L. Assembly of human contact phase proteins and release of bradykinin at the surface of curli-expressing *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1996; 20:927-935.
13. Olsen A, Jonsson A, Normark S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature.* 1989; 338:652-655.
14. Luna-Pineda VM, Moreno-Fierros L, Cázares-Domínguez V, Ilhuicatz-Alvarado D, Ochoa SA, Cruz-Córdova A, et al. Curli of Uropathogenic *Escherichia coli* Enhance Urinary Tract Colonization as a Fitness Factor. *Front Microbiol.* 2019; 10:2063.
15. Carter MQ, Louie JW, Feng D, Zhong W, Brandl MT. Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O157:H7 for initial attachment and biofilm formation. *Food Microbiol.* 2016; 57:81-89.
16. Wallecha A, Oreh H, van der Woude MW, deHaseth PL. Control of gene expression at a bacterial leader RNA, the *agn43* gene encoding outer membrane protein Ag43 of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2014; 196(15):2728-35.
17. Taghadosi R, Shakibaie MR, Ghanbarpour R, Hosseini-Nave H. Role of antigen-43 on biofilm formation and horizontal antibiotic resistance gene transfer in non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains. *Iran J Microbiol.* 2017; 9(2):89-96.
18. Patel JB, Weinstein MP, Eliopoulos GM, Jenkins SG, Lewis JS, Limbago B, et al. Clinical and Laboratory Standards Insitutue. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing in: M100-S23, 27rd ed. Pennsylvania, 2017; 38(3):42-44.
19. Knobloch JK-M, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol.* 2002; 191 (2):101-6.
20. Michael CA, Dominey-Howes D, Labbate M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Front Public Health.* 2014; 2:145-153.
21. Potrykus J, Wegrzyn G. Chloramphenicol-sensitive *Escherichia coli* strain expressing the chloramphenicol acetyltransferase (*cat*) gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(12):3610-2.
22. Haghghatpanah M, Mojtahedi A. Characterization of antibiotic resistance and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from Iranian inpatients with urinary tract infections. *Infect Drug Resist.* 2019; 12:2747-2754.
23. Molaabaszadeh H, Hajisheikhzadeh B, Mollazadeh M, Eslami K, Mohammadzadeh Gheshlaghi N. Study of Sensibility and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infection in Tabriz City. *J Fasa Univ Med Sci.* 2013; 3(2):149. [In Persian].
24. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Dehkordi FS, Ranjbar R, Sarshar M, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2013; 12(1):8.
25. Bahmani N, Abdolmaleki N, Bahmani A. Antimicrobial Resistance in Uropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Beasat Hospital in Sanandaj, West of Iran. *J Pharm Res Int.* 2020; 32(1):32-36.
26. Karigoudar RM, Karigoudar MH, Wavare SM, Mangalgi SS. Detection of biofilm among uropathogenic *Escherichia coli* and its correlation with antibiotic resistance pattern. *J Lab Physicians.* 2019; 11(1):17-22.
27. Tajbakhsh E, Ahmadi P, Abedpour-Dehkordi E, Arbab-Soleimani N, Khamesipour F. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic *E. coli* isolated from clinical samples in Iran. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2016;5:11.
28. Amadu D O, Nwabuisi C, Usman Y, Mustapha J, Abdullahi I N, Popoola A. Biofilm and Extended Spectrum Beta Lactamase Production amongst Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates at the University of Ilorin Teaching Hospital. *Nigeria IJML.* 2019; 6(4):241-250.



29. Katongole P, Nalubega F, Florence NC, Asiimwe B, Andia I. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility and virulence genes of Uropathogenic Escherichia coli isolated from clinical isolates in Uganda. BMC Infect Dis. 2020; 20(1),453.

30. Chen C, Liao X, Jiang H, Zhu H, Yue L, Li S, Fang B, Liu Y. Characteristics of Escherichia coli biofilm production, genetic typing, drug resistance pattern and gene expression under aminoglycoside pressures. Environ Toxicol Pharmacol. 2010; 30:5–10.

Original Article

Relationship between *flu* and *csgA* Virulence Genes and Biofilm Production in Uropathogenic *Escherichia coli*Moghadas Kasani F¹, Salehzadeh A^{1*}, Jalali A²

1. Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran

Received: 01 Sep 2020

Accepted: 01 Oct 2020

Abstract

Background & Objective: There are a variety of virulence factors that allow Uropathogenic *E. coli* (UPEC) to cause infection in the urinary tract among which biofilm production ability plays the most important role. This study aimed to investigate the possibility of a link between biofilm formation and the *flu* and *csgA* virulence genes in this bacterium.

Materials & Methods: The 45 UPEC isolates were collected from patients with the urinary tract infection in Rasht and following the biochemical and microbiological standard tests, the presence of *flu* and *csgA* virulence genes in confirmed isolates was investigated by polymerase chain reaction (PCR). Antibiotic sensitivity of the isolates was studied with antibiogram testing to determine its relationship with biofilm formation ability.

Result: The highest antibiotic resistance profile was seen against chloramphenicol and tetracycline. Based on PCR test results, 60% and 82% of isolates have *flu* and *csgA* virulence genes, respectively and both genes were present in 55.5% of isolates. Four isolates with low, 10 isolates with strong and 11 isolates with moderate biofilm formation abilities were found to have both *flu* and *csgA* genes.

Conclusion: The results showed a significant association between the presence of *flu* and *csgA* genes and biofilm production abilities in UPEC strains. Therefore, these genes can be further investigated as a suitable target for therapeutic interventions. In addition, due to the high resistance of these isolates to chloramphenicol and tetracycline antibiotics, these antibiotics are not recommended for the treatment of patients with urinary tract infections.

Keywords: Uropathogenic *Escherichia coli*, Biofilm, Urinary tract infection, *flu*, *csgA*

*Corresponding Author: Salehzadeh Ali, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Email: salehzadeh@iaurasht.ac.ir

<https://orcid.org/0000-0003-4238-0999>