



Comparison of Tissue Culture Plate, Congo red Agar and Tube Methods for Evaluation of Biofilm Formation among *Uropathogenic E. coli* Isolates

Nafiseh Nosrati¹, Sahar Honarmand Jahromy¹, Shohreh Zare Karizi²

1. Department of Microbiology, Islamic Azad University, Varamin- Pishva Branch, Varamin, Iran
2. Department of Genetic, Islamic Azad University, Varamin- Pishva Branch, Varamin, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2016/11/17
Accepted: 2017/07/09
Available online: 2017/08/08

Article Subject:

Medical Bacteriology

IJMM 2017; 11(3): 49-58

Corresponding author:

Dr. Sahar Honarmand Jahromy

Department of Microbiology,
Islamic Azad University,
Varamin- Pishva Branch,
Varamin, Iran

Tel: 0989124364257

Email:

sahar_hj2@yahoo.com

Abstract

Background and Aims: Microorganisms within biofilms, formed on medical devices in the body are highly resistant to antimicrobial compounds and host responses and play a major role in nosocomial infections, especially urinary tract infections (UTIs). *Uropathogenic Escherichia coli* (*UPEC*) causes 50% of the hospital-acquired urinary tract infections and is capable to form biofilm in the bladder epithelium which plays an important role in its pathogenesis. The identification of biofilm producing *UPEC* strains by routine laboratory methods is important for the better understanding of the pathogenesis of this bacterium in UTIs.

Materials and Methods: A total of 100 *UPEC* strains were collected from patients with UTIs in a hospital in Tehran in 2016 and diagnosed by biochemical tests and the ability of biofilm formation was determined by Tissue Culture Plate (TCP), tube method (TM) and Congo red agar (CRA) methods. Sensitivity and specificity of methods were determined.

Results: In tube method, 23% of the isolates formed strong and 59% formed weak biofilm. In Tissue Culture Plate method 40%, 22% and 28% of isolates formed strong, moderate and weak biofilm respectively and 10% were biofilm negative. According to the Congo red agar method only 4% of the isolates formed strong biofilm, 65% and 31% respectively had a weak biofilm and no biofilm. The sensitivity and specificity of Congo red agar and Tube methods were 39.1%, 50.9% and their features were 78.3%, 79.7% respectively.

Conclusions: The results showed that Tissue Culture Plate method is important for the determination of *UPEC* biofilm formation. Tube method and Congo red agar are not reliable methods for this purpose.

KeyWords: *Uropathogenic Escherichia coli*, Biofilm formation, Phenotypic methods

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

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. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (3): 49-58



Farname Inc.

مقایسه روش‌های صفحه کشت بافت، کنگورد آگار و لوله برای سنجش بیوفیلم

اشریشیا کلی یوروپاتوژن

نفیسه نصرتی^۱، سحر هنرمند جهرمی^۱، شهره زارع کاریزی^۲

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران
 ۲. گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: میکروارگانیسم‌های موجود در بیوفیلم باکتریایی که در دستگاه‌های پزشکی قرار داده شده در بافت‌های بدن یافت می‌شوند، به ترکیبات ضد میکروبی مقاوم هستند و نقش عمده‌ای در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه عفونت مجاری ادراری دارند. *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن شایع‌ترین عامل عفونت‌های ادراری بیمارستانی است و قادر به تشکیل بیوفیلم در سلول‌های اپی تلیوم متانه بوده و این امر نقش مهمی در بیماری‌زایی آن بازی می‌کند. شناسایی جدایه‌های تولیدکننده بیوفیلم *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی برای درک بهتر نقش این باکتری در عفونت ادراری مهم است.

مواد و روش کار: ۱۰۰ جدایه *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری مراجعه کننده به بیمارستان میلاد تهران در سال ۱۳۹۴ جمع‌آوری شد. تشخیص جدایه‌ها توسط تست‌های بیوشیمیایی و توانایی تشکیل بیوفیلم به وسیله روش‌های صفحه کشت بافت، کنگورد آگار و لوله تعیین شد. حساسیت و ویژگی روش‌ها ارزیابی شد.

یافته‌ها: در روش لوله ۲۳٪ و ۵۹٪ جدایه‌ها دارای بیوفیلم قوی و بیوفیلم ضعیف بودند. در روش کشت بافت ۴۰٪، ۲۲٪ و ۲۸٪ جدایه‌ها به ترتیب بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف تشکیل دادند و ۱۰٪ بیوفیلم منفی بودند. با روش کنگورد آگار تنها ۴٪ سویه‌ها بیوفیلم قوی داشتند، ۶۵٪ و ۳۱٪ به ترتیب بیوفیلم ضعیف و فاقد بیوفیلم بودند. حساسیت روش‌های کنگورد آگار و لوله به ترتیب ۳۹/۱٪ و ۵۰/۹٪ و ویژگی آن‌ها به ترتیب ۷۸/۳٪ و ۷۹/۷٪ به دست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد روش کشت بافت برای تعیین تشکیل بیوفیلم *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن مهم است. کنگورد آگار و لوله روش‌های مناسبی برای این منظور نیستند.

کلمات کلیدی: *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن، تشکیل بیوفیلم، روش‌های فنوتیپی

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله
 دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۲۷
 پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۱۸
 انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۵/۱۷

موضوع:
 باکتری شناسی پزشکی

IJMM 1396; 11(3): 49-58

نویسنده مسئول:

دکتر سحر هنرمند جهرمی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم
 زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد
 پیشوا، ورامین، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۱۲۴۳۶۴۲۵۷

پست الکترونیک:

sahar_hj2@yahoo.com

مقدمه

میزبان، اغلب منجر به بروز عفونت‌هایی می‌شود که مقاومت بالایی به ترکیبات ضد میکروبی و پاسخ‌های میزبانی نشان می‌دهند (۲). مطالعات نشان داده که بیوفیلم‌های باکتریایی عامل ۸۰٪ موارد عفونت‌های میکروبی هستند که ریشه‌کنی و درمان آنتی‌بیوتیکی آن‌ها بسیار دشوار است (۳). بیوفیلم‌های باکتریایی نقش عمده‌ای در شکل‌گیری عفونت‌های بیمارستانی و عفونت مجاری ادراری دارند و سبب بروز عفونت‌های مکرر می‌گردند که باعث برگشت بیماری و بروز پروستاتیت حاد

بیوفیلم‌ها جمعیت‌های میکروبی هستند که به یکدیگر و بر روی سطوح می‌چسبند و توسط یک ماتریکس پلیمری خارج سلولی که خود می‌سازند، احاطه می‌شوند (۱). بیوفیلم‌های باکتریایی در همه‌جا حضور دارند و می‌توانند در مکان‌ها یا زیستگاه‌های مختلفی یافت شوند. آن‌ها می‌توانند متشکل از یک یا چندگونه مختلف باکتریایی باشند که قادرند ساختارهای پیچیده‌ای را بسازند. تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های بیماری‌زا بر روی بافت‌ها یا ابزارهای پزشکی و کار گذاشته شده در بدن

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی جدایه های اشریشیاکلی

یوروپاتوزن

این مطالعه مشاهده‌ای توصیفی بر روی تعداد ۲۳۰ نمونه میانی ادرار جمع‌آوری شده در شرایط استریل از بیماران مراجعه‌کننده در فاصله زمانی اردیبهشت تا تیرماه ۱۳۹۴ به صورت بستری و سرپایی به آزمایشگاه تشخیص طبی بیمارستان میلاد تهران انجام شد. نمونه‌های ادراری حاوی باکتری (بیش از 10^5 CFU/mL) به عنوان مورد مبتلابه عفونت ادراری در نظر گرفته شدند. نمونه‌ها جهت انجام آزمایش‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند و سپس در پلیت های حاوی محیط مک کانکی آگار (Merck, Germany) و EMB آگار (Merck, Germany) کشت داده شدند و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. شناسایی جدایه های اشریشیا کلی بر اساس خصوصیات مورفولوژی و انجام تست‌های بیوشیمیایی شامل کشت در محیط TSI آگار، SIM، سیمون سیترات و محیط مایع MRVP (Merck, Germany) انجام گرفت (۱۴).

تشخیص تولید بیوفیلیم در جدایه های اشریشیا کلی

یوروپاتوزن

کلیه جدایه های اشریشیا کلی یوروپاتوزن جهت سنجش میزان تشکیل بیوفیلیم با سه روش کشت صفحه بافت، کنگورد آگار و لوله مورد ارزیابی قرار گرفتند.

روش صفحه کشت بافت (TCP)

کشت شبانه‌روزی از جدایه های اشریشیا کلی یوروپاتوزن در محیط تریپتیکاز سوی آگار (Merck, Germany) همراه با ۲٪ گلوکز انجام شد. کشت‌های باکتریایی رقیق شدند و سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند در محیط تریپتیکاز سوی برات تهیه شد. ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه‌شده از هر سویه باکتری به درون ۳ چاهک از پلیت ۹۶ خانه پلی استیرنی منتقل شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از این مدت پلیت‌ها خالی شده و با محلول بافر فسفات (pH7, PBS) دومتبه شستشو داده شدند. بعد از خشک شدن، چاهک‌ها با الکل متانول ۹۵٪ درصد به مدت ۱۵ دقیقه تثبیت شدند و سپس با رنگ کریستال ویوله (۱٪) به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پلیت‌ها خالی‌شده و با آب

می‌شود (۴). عفونت ادراری یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ‌ومیر و بروز معضلات مهم پزشکی است که به خاطر مقاومت آنتی‌بیوتیکی و میزان بالای بازگشت بیماری منجر به آسیب‌های جدی به سلامت بیماران می‌شود (۵). باکتری اشریشیاکلی عامل بیش از ۸۰٪ موارد عفونت‌های ادراری است (۶) و پاتوتایپ اشریشیاکلی یوروپاتوزن (*Uropathogenic Escherichia coli*) شایع‌ترین عامل ۹۰-۷۰٪ موارد عفونت مجاری ادراری اکتسابی از جامعه و ۵۰٪ از موارد عفونت‌های ادراری اکتسابی از بیمارستان است (۷). مطالعات نشان داده که سویه‌های UPEC به‌عنوان عوامل بیماری‌زای درون‌سلولی عمل کرده که در مثانه استقرار می‌یابند و باعث سیستیت شده و از طریق مجرای ادراری به طرف کلیه‌ها رفته و پیلونفریت ایجاد می‌کنند (۸). اتصال باکتری به سلول‌های اپی تلیال تناسلی معمولاً برای UPEC بسیار مهم و اساسی است، زیرا برخلاف سایر باکتری‌ها به سرعت شسته نمی‌شود (۹). این باکتری قادر است تجمعات بین سلولی مشابه ساختارهای بیوفیلیم در اپیتلیوم مثانه تشکیل دهد (۱۰). بنابراین تشکیل بیوفیلیم نقش مهمی در بیماری‌زایی UPEC ایفا می‌کند (۱۱). شناسایی سویه‌های UPEC تولیدکننده بیوفیلیم برای درک بهتر بیماری‌زایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری در ایجاد عفونت ادراری حائز اهمیت است. با این حال تشخیص بیوفیلیم باکتریایی به روش‌های متداول مورد استفاده در آزمایشگاه‌ها امکان‌پذیر نمی‌باشد. سیستم‌های متعددی به‌طور رایج برای مطالعه بیوفیلیم باکتریایی استفاده می‌شوند، اگرچه بخشی از میزان تشکیل بیوفیلیم باکتریایی بستگی به نوع محیط کشت داشته و تحت تأثیر روش به‌کاررفته برای سنجش بیوفیلیم قرار دارد (۱۲). رشد بیوفیلیم و مشاهده با میکروسکوپ‌هایی مانند میکروسکوپ لیزری اسکن کانفوکال، روش کمی سیستم‌های بسته تحت شرایط استاتیکی مانند روش صفحه کشت بافت (Tissue Culture Plate) و مشاهده با یک‌رنگ غیراختصاصی، بیوفیلیم های شناور (liquid-air pellicles)، مشاهده کلنی‌های باکتریایی بر روی سطح یک محیط جامد مانند Congo Red Agar و روش ساده لوله (Tube method) از جمله روش‌های سنجش بیوفیلیم هستند (۱۳). هدف از این مطالعه مقایسه توانایی روش‌های TCP، TM و CRA برای تشخیص بیوفیلیم جدایه های اشریشیاکلی به‌دست‌آمده از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری مراجعه‌کننده به بیمارستان میلاد تهران است.

مقطر استریل شستشو داده شد. لوله‌ها به صورت وارونه قرار داده شده تا خشک شوند. نتایج مربوط به جدایه های /شریشیا کلی یوروپاتوزن تشکیل دهنده اسلایم یا بیوفیلیم بر اساس ضخامت رنگ کریستال ویوله بر روی ته و جداره لوله به به صورت مشاهده یک لایه نازک قابل رؤیت در کنار بدنه و ته لوله، بیوفیلیم متوسط (Moderate) در نظر گرفته شد. مشاهده لایه ضخیم قابل رؤیت در کنار بدنه و ته لوله، بیوفیلیم قوی (Strong) در نظر گرفته شد و فقدان لایه قابل رؤیت در کنار بدنه و ته لوله بیوفیلیم منفی در نظر گرفته شد (۱۷). آزمایش در سه تکرار انجام شد.

آنالیز آماری

در این مطالعه روش کشت بافت به عنوان استاندارد طلایی جهت بررسی تشکیل بیوفیلیم سویه‌ها استفاده شد (۱۸). آزمون حساسیت و ویژگی برای روش‌های کنگورد آگار و کدورت در لوله از رابطه زیر محاسبه گردید (۱۹). نتایج با بسته نرم افزار آماری (SPSS-21, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) و تست منحنی راک (ROC curve) تأیید گردید

$$\text{حساسیت} = \frac{\text{مثبت حقیقی}}{\text{مثبت حقیقی} + \text{منفی کاذب}} \times 100$$

$$\text{ویژگی} = \frac{\text{منفی حقیقی}}{\text{مثبت کاذب} + \text{منفی حقیقی}} \times 100$$

یافته‌ها

فراوانی جدایه های /شریشیا کلی یوروپاتوزن در نمونه ادرار بیماران

از ۲۳۰ نمونه ادرار جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری با انجام تست‌های بیوشیمیایی، ۱۰۰ جدایه /شریشیا کلی شناسایی شد. فراوانی جدایه ها در نمونه ادرار بیماران بر اساس سن، جنسیت و بستری یا سرپایی بودن بیماران تعیین شد. ۱۴ جدایه /شریشیا کلی یوروپاتوزن از نمونه مردان و ۸۶ جدایه از نمونه زنان به دست آمد. بیماران بر اساس گروه سنی به چهار گروه ۰-۱۹، ۲۰-۳۹، ۴۰-۵۹، ۶۰-۸۰ و ۸۰-۹۰ سال تقسیم شدند. فراوانی جدایه ها در هر گروه سنی به ترتیب ۰، ۳۷/۵٪، ۳۷٪ و ۴۱/۹٪ گزارش شد. ۸۲ جدایه مربوط به نمونه ادراری بیماران سرپایی و ۱۸ جدایه مربوط به نمونه ادرار بیماران بستری بودند.

مقطر استریل شسته شدند. چاهک‌ها جهت بررسی نتایج با دستگاه خوانش (ELISA reader Citation 3, Biotek, USA) و در طول موج ۵۷۰ نانومتر، با ۱۰۰ میکرولیتر محلول اسید استیک گلاسیال ۳۳٪ پر شدند (۱۴). جهت بررسی توانایی تشکیل بیوفیلیم سویه‌ها، از روش تعیین معیار طبقه بندی مقادیر جذب نوری یا ODc (Optical Density cut-off value) استفاده شد (۱۵). ODc از رابطه میانگین OD کنترل منفی به اضافه ۳ برابر انحراف معیار کنترل منفی به دست آمد. سویه‌ها بر اساس جدول ۱ از نظر بیوفیلیم به چهار گروه تقسیم شدند.

برای هر جدایه سه تکرار انجام شد. سویه *E. coli 1399* به عنوان کنترل مثبت و ۲۰۰ میکرولیتر محیط تریپتیکاز سوی برات همراه با ۲٪ گلوکز به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

روش کنگورد آگار (CRA)

معرف کنگورد (۸ گرم بر لیتر) (Merck, Germany) به صورت یک محلول آبی به طور مجزا، تهیه شده و در ۱۲۱ درجه سلسیوس مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. پس از تهیه محیط برین هرت اینفوژن برات همراه با آگار (Merck, Germany) ۱۰ گرم بر میلی لیتر، معرف همراه با ۵۰ گرم بر لیتر ساکارز (Merck, Germany) به محیط اضافه شد. محیط کشت‌های تهیه شده پس از سفت شدن، تا زمان استفاده در دمای یخچال نگهداری شدند. با برداشتن کلنی تک باکتری‌ها از محیط کشت EMB آگار به وسیله لوپ، در سطح محیط کنگورد آگار کشت داده شدند. پلیت‌ها به صورت هوازی به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند (۱۶).

روش کدورت در لوله (TM)

پس از تهیه محیط تریپتیکاز سوی آگار (Merck, Germany)، باکتری‌های /شریشیا کلی در محیط، کشت داده شده و پس از ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، سوسپانسیون باکتری تهیه شد. سپس یک لوپ کامل از سوسپانسیون باکتری به لوله حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط تریپتیکاز سوی برات همراه گلوکز ۲٪ منتقل شد. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شدند. بعد از آن محتویات لوله‌ها را خارج کرده و با محلول بافر فسفات (pH 7.3) شستشو داده شد و پس از خشک شدن لوله‌ها با کریستال ویوله ۱٪ رنگ آمیزی شدند. رنگ اضافه به وسیله آب

تولید بیوفیلیم در جدایه‌های اشریشیاکلی یوروپاتوزن

روش صفحه کشت بافت (TCP)

در بررسی تشکیل بیوفیلیم به روش TCP که روش استاندارد است پس از قرائت نتایج و تعیین ODc (جدول ۱)، ۴۰

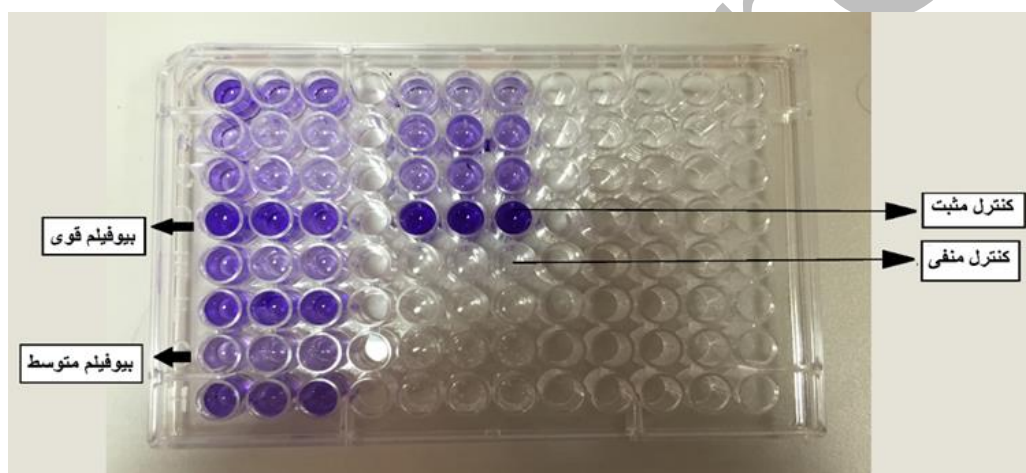
جدول ۱: تفسیر نتایج تشکیل بیوفیلیم سویه‌های اشریشیاکلی یوروپاتوزن با روش TCP

توانایی تشکیل بیوفیلیم	نتایج مقادیر میانگین OD	محاسبه میزان ODc
قوی	$OD > 0.929$ نمونه	$OD > 4 \times ODc$ نمونه
متوسط	$0.464 < OD \leq 0.929$ نمونه	$2 \times ODc < OD \leq 4 \times ODc$ نمونه
ضعیف	$0.232 < OD \leq 0.464$ نمونه	$ODc < OD \leq 2 \times ODc$ نمونه
منفی	$OD \leq 0.232$ نمونه	$OD \leq ODc$ نمونه

(Sd) = 0.3214 انحراف معیار

(mean) = 0.136 میانگین

$ODc = 0.232$

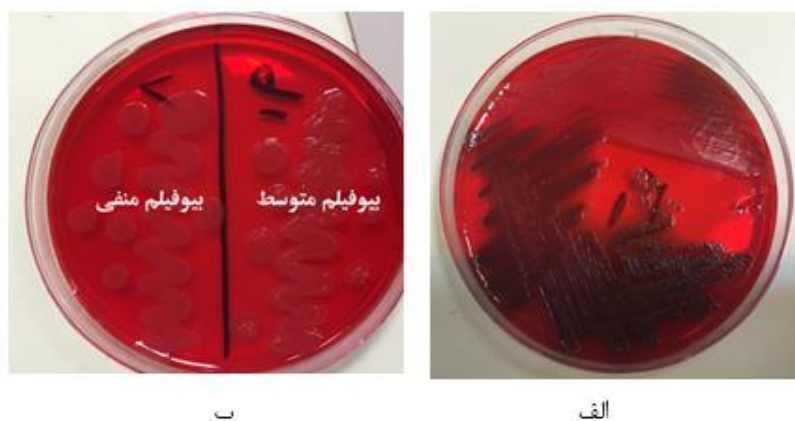


شکل ۱. تشکیل بیوفیلیم اشریشیاکلی یوروپاتوزن به روش TCP

سطح و لبه‌های خشن به‌عنوان تولیدکننده متوسط اسلایم در نظر گرفته شدند. کلنی‌های قرمز رنگ با سطح صاف و براق از نظر تولید اسلایم منفی در نظر گرفته شدند. بر اساس خصوصیات کلنی‌های تشکیل شده (شکل ۲)، ۴ جدایه تشکیل بیوفیلیم قوی، ۶۵ جدایه تشکیل بیوفیلیم ضعیف و ۳۱ جدایه فاقد قدرت تشکیل بیوفیلیم بودند.

نتایج روش کنگور آگار (CRA)

نتایج مربوط به جدایه‌های اشریشیاکلی یوروپاتوزن تشکیل‌دهنده اسلایم یا بیوفیلیم با روش CRA بر اساس شکل ظاهری کلنی‌ها تفسیر شدند. کلنی‌های سیاه‌رنگ با ظاهر و قوام خشک و سطح و لبه‌های خشن به‌عنوان تولیدکننده‌های قوی اسلایم در نظر گرفته شدند. کلنی‌های سیاه‌رنگ با سطح صاف و گرد و براق و همچنین کلنی‌های قرمز رنگ با ظاهر خشک و



شکل ۲: تشکیل بیوفیلم در محیط کنگورد آگار، الف: کلنی‌های سیاه‌رنگ و خشن نشان‌دهنده تشکیل بیوفیلم قوی. ب: کلنی‌های قرمز یا صورتی با ظاهر خشن نشان‌دهنده تشکیل بیوفیلم ضعیف (سمت راست)، کلنی‌های قرمز یا صورتی با ظاهر صاف نشان‌دهنده عدم قدرت تشکیل بیوفیلم (سمت چپ)

ویژگی برای روش‌های کنگورد آگار و کدورت لوله مشخص گردید. ویژگی و حساسیت روش CRA به ترتیب ۹/۵۰٪ و ۱/۳۹٪ گزارش شد. ویژگی و حساسیت برای روش TM به ترتیب ۴۱/۷۹٪ و ۲۵/۲۸٪ گزارش شد (جدول ۲).

جدول ۲: حساسیت و اختصاصیت دو روش CRA و TM در مقایسه با

روش TCP

Method	Sensitivity	Specificity
Tube Method	۳/۷۸٪	۹/۷۹٪
Congo red agar	۱/۳۹٪	۹/۵۰٪

بحث

باکتری‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم در ۸۰٪ از کل موارد عفونت‌ها دخالت دارند و یکی از معضلات مهم اورولوژی اند که تشکیل بیوفیلم آن‌ها مشکل جدی محسوب می‌شود. ریشه‌کنی باکتری‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم به دلیل ایجاد فنوتیپ مقاوم، سخت است و درمان‌های ترکیبی برای عفونت‌های مرتبط با بیوفیلم توصیه می‌شود. به همین جهت تشخیص سوبه‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم باکتری‌های عامل عفونت ادراری و غربالگری آن‌ها با اتخاذ روش مناسب و سریع می‌تواند منجر به انتخاب راه درمانی مناسب و پیش‌گیری از عود عفونت و ممانعت از ایجاد مشکلات شدید ادراری مانند پیلونفریت و پروستاتیت شود. این مطالعه هم‌زمان به مقایسه سه روش فنوتیپی رایج CRA، روش TM و روش TCP برای سنجش بیوفیلم اشیریشیا کلی یورویاتوزن پرداخته است.

نتایج روش کدورت در لوله (TM)

در روش TM (شکل ۳)، ۲۳ جدایه تشکیل بیوفیلم قوی و ۵۹ جدایه تشکیل بیوفیلم ضعیف دادند و ۱۸ جدایه از نظر تشکیل بیوفیلم منفی بودند.



شکل ۳: تشکیل بیوفیلم به روش لوله. A: عدم مشاهده لایه قابل‌رویت در جدار و ته لوله: بیوفیلم منفی، B: مشاهده لایه ضخیم قابل‌رویت در جدار و ته لوله: بیوفیلم قوی و C: مشاهده یک‌لایه نازک قابل‌رویت در جدار و ته لوله: بیوفیلم ضعیف

نتایج تعیین حساسیت و ویژگی روش‌های کنگورد

آگار و کدورت در لوله

با توجه به اینکه روش TCP روش استاندارد طلایی برای تشخیص بیوفیلم محسوب می‌شود، تعیین آزمون حساسیت و

اشریشیاکلی توانایی تشکیل بیوفیلم قوی در محیط BHI را دارند و ۴۴/۷٪ جدایه‌های اشریشیاکلی در محیط تریپتیکاز سوی برات تشکیل بیوفیلم دادند (۲۴).

بررسی تشکیل بیوفیلم توسط روش CRA نشان داد تنها چهار جدایه توانایی تولید بیوفیلم قوی بر روی محیط کنگورد آگار داشتند که توسط کلنی‌های سیاه نشان داده شدند و ۶۵٪ بیوفیلم متوسط داشتند. با روش TM ۲۳٪ سویه‌ها توانایی تشکیل بیوفیلم قوی داشتند و ۵۹٪ تشکیل بیوفیلم متوسط دادند.

Ponnusamy و همکاران سال ۲۰۱۲، ۱۰۰ جدایه اشریشیاکلی یورپاتوزن را از نظر تشکیل بیوفیلم با روش‌های TCP، TM و CRA موردسنجش قرار دادند. با روش TM، ۱۷/۲۳٪ بیوفیلم قوی، ۲۶/۳٪ بیوفیلم متوسط و ۵۰٪ بیوفیلم ضعیف بودند. با روش CRA جدایه‌های بیوفیلم مثبت به ۲۳/۲۳٪ قوی، ۳۷٪ متوسط و ۴۰٪ ضعیف تقسیم شدند در حالی که در روش TCP، ۶٪ جدایه‌ها بیوفیلم قوی، ۸۰٪ بیوفیلم متوسط و ۱۴٪ بیوفیلم ضعیف تشکیل دادند. در این تحقیق روش TM روش مناسب برای سنجش بیوفیلم اشریشیاکلی معرفی نشد (۲۵).

Knobloch و همکاران سال ۲۰۰۲، ۱۲۸ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس را جهت بررسی تشکیل بیوفیلم به روش CRA موردبررسی قرار دادند و مشاهده کردند که با این روش فقط ۳/۸٪ سویه‌ها توانایی تشکیل بیوفیلم داشتند بنابراین گزارش دادند که روش کنگورد آگار روش مناسبی برای سنجش تشکیل بیوفیلم محسوب نمی‌شود (۲۶). طی تحقیق دیگری توسط Růžička و همکاران در سال ۲۰۰۴، ۱۴۷ جدایه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس را جهت بررسی تشکیل بیوفیلم به روش لوله و CRA مورد ارزیابی قرار دادند و مشاهده کردند که ۷۹٪ جدایه (۵۳/۷٪) با روش TM و ۶۴٪ (۴۳/۵٪) جدایه با روش CRA توانایی تشکیل بیوفیلم داشتند. همچنین اظهار داشتند که روش TM روش بهتری برای تشخیص بیوفیلم نسبت به روش CRA است (۲۷). نتایج مشابه در تحقیق Oliveira و همکاران در سال ۲۰۱۰ به دست آمد که در آن، از ۱۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز منفی مورد مطالعه، ۸۱٪ با روش TCP، ۷۳٪ با روش CRA و ۸۲٪ با روش TM تشکیل بیوفیلم دادند (۲۸).

در تحقیق حاضر روش TCP به‌عنوان یک روش استاندارد طلایی در تشخیص بیوفیلم مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که تمام جدایه‌های اشریشیاکلی از نظر توانایی خود برای تولید بیوفیلم بر روی سطح پلیت میکروتیتر به چهار گروه قوی (۴۰٪)، متوسط (۲۲٪)، ضعیف (۲۸٪) و منفی (۱۰٪) تقسیم شدند.

Cucarella و همکاران در سال ۲۰۰۱، ۱۴ ایزوله اشریشیاکلی را از نظر توانایی تولید بیوفیلم در شرایط آزمایشگاهی توسط TCP مورد ارزیابی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که از ۱۴ سویه اشریشیاکلی، ۱۰ سویه از نظر تشکیل بیوفیلم مثبت بودند (۲۰). Naves و همکاران در سال ۲۰۰۸، توانایی تشکیل بیوفیلم اشریشیاکلی به روش TCP را در محیط‌های لوریا برتانی، M63، M9، MHII مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که تشکیل بیوفیلم در محیط M9 و MHII بیشتر از تشکیل بیوفیلم در محیط‌های M63 و لوریا برتانی است. این مطالعه نشان داد که توانایی تشکیل بیوفیلم باکتری تحت تأثیر محیط کشت، ممکن است متفاوت باشد (۲۱). Samet و همکاران طی سال‌های ۲۰۱۰ و ۲۰۱۱، ۱۷۰ نمونه اشریشیاکلی بیمارستانی و غیر بیمارستانی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری را جهت بررسی تشکیل بیوفیلم به روش TCP در محیط‌های LB و BHI برات با افزودن ساکاروز ۱٪ مورد مطالعه قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که ۲۰٪ جدایه UPEC (۱۱/۳٪) در محیط LB و ۱۰۵٪ جدایه (۶۱/۸٪) در محیط BHI برات تشکیل بیوفیلم دادند (۲۲). این مطالعات نشان داد که نوع محیط کشت می‌تواند بر روی میزان تشکیل بیوفیلم باکتریایی تأثیر داشته باشد. Thilakavathy و همکاران در سال ۲۰۱۵، ۴۵۶ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس را جهت بررسی تشکیل بیوفیلم به روش‌های TM، CRA و TCP مورد ارزیابی قرار دادند و مشاهده کردند که درصد تولید بیوفیلم در هنگام سنجش با روش TCP (۳۹،۵۷٪) بالاترین میزان بود. تشکیل بیوفیلم با روش‌های TM و CRA به ترتیب، ۳۰/۲٪ و ۱۷/۷٪ گزارش شد (۲۳). طی مطالعه‌ای که Mathur و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس انجام دادند، تعداد تولیدکنندگان بیوفیلم با روش TCP بالا و ۵۳/۹٪ تشخیص داده شد و با روش‌های TM و CRA به ترتیب ۱۱/۸٪ و ۵/۱۷٪ جدایه‌ها تولیدکننده بیوفیلم بودند (۱۸). در سال ۲۰۰۷ Skyberg و همکاران تشکیل بیوفیلم اشریشیاکلی به روش TCP را در محیط‌های BHI و تریپتیکاز سوی برات مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که فقط ۲۹/۴٪ سویه‌های

روش TM، ۸۴/۳٪ و ۵۸/۶٪ و برای هر دو روش TCP اصلاح شده ۸۸/۶٪ و ۶۳/۹٪ بود (۳۱).

Oliveira و همکاران حساسیت و ویژگی روش TM را جهت بررسی تشکیل بیوفیلم سویه‌های استافیلوکوکوس کواگولاز منفی مورد ارزیابی قرار دادند و مشاهده کردند که حساسیت روش TM ۷۱/۸۸٪ و ویژگی آن ۸۸/۸۹٪ گزارش شد (۲۸). Panda و همکاران در سال ۲۰۱۶، حساسیت و ویژگی روش‌های TM، CRA و TCP جهت بررسی تشکیل بیوفیلم سویه‌های مختلف باکتریایی (شریشیاکلی، کلبسیلا و سودوموناس) را مورد بررسی قرار دادند و گزارش دادند که حساسیت روش TM ۸۱٪ و ویژگی آن ۹۵/۰۱٪ است و حساسیت روش CRA ۱۶/۰۸٪ و ویژگی آن ۹۳/۰۹ است (۳۲). در مطالعه حاضر با اینکه روش TM ۴۰ جدایه تشکیل‌دهنده قوی بیوفیلم را تشخیص داد، ولی در مقایسه با نتایج روش TCP که به عنوان استاندارد طلایی انتخاب شد، تعداد مثبت‌های حقیقی کمتری را نشان داد که همین امر میزان حساسیت روش TM را بسیار کاهش داده است. روش TCP روش دقیق و مناسب برای سنجش بیوفیلم /شریشیاکلی است و روش‌های TM و CRA روش‌های قابل‌اعتمادی برای این منظور نیستند. از طرفی تشکیل بیوفیلم توسط /شریشیاکلی بستگی به خصوصیات جدایه‌های مورد مطالعه، توانایی باکتری برای سازش با شرایط محیط کشت، فاکتورهای محیطی و نوع روش بررسی دارد. بنابراین بررسی موارد ذکر شده در مطالعات بعدی توصیه می‌شود.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از مسئول و کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین پیشوا و جناب آقای امید حسینی کارشناس آزمایشگاه جامع تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی که ما را در اجرای این پژوهش یاری نمودند تقدیر و تشکر می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

Deka و همکاران در سال ۲۰۱۴، ۱۰۰ جدایه استافیلوکوکوس کواگولاز منفی را جهت بررسی تشکیل بیوفیلم به روش TM مورد ارزیابی قرار دادند و مشاهده کردند که از بین ۱۰۰ جدایه، ۲۱ جدایه تشکیل بیوفیلم قوی، ۳۶ جدایه تشکیل بیوفیلم متوسط و ۴۳ جدایه تشکیل بیوفیلم ضعیف یا منفی دادند (۲۹). مطالعه حاضر در موافقت با سایر نتایج ذکر شده است که در آن‌ها روش CRA و روش TM نسبت به روش کمی TCP ارزش کمتری در تعیین قدرت تشکیل بیوفیلم سویه‌های باکتریایی دارند.

در این تحقیق برای مقایسه دو روش کیفی TM و CRA با روش کمی TCP به‌عنوان روش استاندارد طلایی جهت سنجش میزان تشکیل بیوفیلم /شریشیاکلی یوروپاتوزن، درصد ویژگی و حساسیت دو روش مورد بررسی قرار گرفت. حساسیت روش CRA (۳۹/۱٪) در مقایسه با روش TM (۷۸/۳٪) بسیار کمتر بود. همچنین ویژگی روش CRA (۵۰/۹٪) و ویژگی روش TM (۷۹/۷٪) گزارش شد. در مطالعه Hassan و همکاران در سال ۲۰۱۱، ۱۵۰ نمونه کلینیکی (استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، شریشیاکلی و سودوموناس آئرئینوزا) از بیماران بستری در بخش‌های مراقبت ویژه جهت بررسی تشکیل بیوفیلم توسط روش‌های TM، CRA و TCP مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که روش TCP، یک روش قابل‌اعتماد و استاندارد طلایی برای تشخیص بیوفیلم است و حساسیت روش CRA (۱۱٪) در مقایسه با روش TM (۷۳٪) بسیار کم است (۳۰). در سال ۲۰۱۴ Saxena و همکاران دو روش TM و TCP اصلاح‌شده با اسید استیک گلاسیال و بدون اسید استیک را برای بررسی بیوفیلم جدایه‌های سودوموناس آئرئینوزا/ی جداشده از عفونت مجاری تنفسی مورد مطالعه قرار دادند. با روش TM ۲۰٪ جدایه‌ها بیوفیلم قوی، ۲۱/۲۵٪ متوسط و ۵۸/۷۵٪ بیوفیلم منفی بودند. با روش TCP اصلاح‌شده با اسید استیک گلاسیال ۲۳/۶٪ جدایه‌ها دارای بیوفیلم قوی و ۷۴/۴٪ بیوفیلم متوسط داشتند ولی با روش TCP بدون گلاسیال ۲۰٪ بیوفیلم قوی و ۸۰٪ بیوفیلم متوسط بودند. ویژگی و حساسیت

References

1. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Rev Microbiol.* 2010;8(9):623-33.
2. Da Re S, Le Quéré B, Ghigo JM, Beloin C. Tight modulation of *Escherichia coli* bacterial biofilm formation through controlled expression of adhesion factors. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(10):3391-403.
3. Römling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med.* 2012; 272(6):541-61.
4. Tenke P, Kovacs B, Jäckel M, Nagy E. The role of biofilm infection in urology. *World J Urol.* 2006; 24(1):13.
5. Anderson GG, Martin SM, Hultgren SJ. Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract. *Microbes Infect.* 2004; 6(12):1094-101.
6. Reisner A, Maierl M, Jörger M, Krause R, Berger D, Haid A, et al. Type 1 fimbriae contribute to catheter-associated urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2014; 196(5):931-9.
7. Mulvey MA, Schilling JD, Martinez JJ, Hultgren SJ. Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proc Natl Acad Sci.* 2000; 97(16): 8829-35.
8. Subashchandrabose S, Mobley HLT. Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 2015;3(4):1-34.
9. Stickler DJ. Urinary catheters: ideal sites for the development of biofilm communities. *Microbiol.* 2005; 5(11):598-608.
10. Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science.* 2003; 301(5629):105-7.
11. Soto S, Smithson A, Martinez J, Horcajada J, Mensa J, Vila J. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. *J Urol.* 2007; 177(1):365-8.
12. Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S. In Vitro Biofilm Formation of Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Strains: Impact of Environmental and Genetic Factors. *Bacteriol.* 2006; 188(10): 3572-3581.
13. Meshram L, Patidar RK, Khare M, Bagde S, Sahare KN, Singh V. Comparative analysis between biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Asiatic J Biotechnol Res.* 2012;3:1441-6. Branda SS, Vik Å, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 2005;13(1):20-6.
14. Collee DJ, Duguid P, Fraser AG, Marmion BP, Mackie and McCartney: Practical medical microbiology, 13th edition; Churchill Livingstone; 1989.
15. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura GD, Djukić S, Ćirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis.* 2007; 115(8):891-9.
16. Freeman D, Falkiner F, Keane C. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 1989;42(8):872-4.
17. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun.* 1982;37(1):318-26.
18. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay D, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol.* 2006; 24(1):25.
19. Melo PdC, Ferreira LM, Nader Filho A, Zafalon LF, Vicente HIG, Souza Vd. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Braz J Microbiol.* 2013; 44(1):119-24.
20. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa Í, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol.* 2001; 183(9): 2888-96.
21. Naves P, Del Prado G, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, Blanco J, et al. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *J Appl Microbiol.* 2008; 105(2): 585-90.
22. Samet M, Ghaemi E, Jahanpur S, Jamalli A. Evaluation of biofilm-forming capabilities of urinary *Escherichia coli* isolates in microtiter plate using two different culture media. *Inter J Mol Clin Microbiol.* 2013; 1:244-247.
23. Thilakavathy P, vaSanTha PRiyan RM, Jagatheeswari PaT, Charles J, Dhanalakshmi V, lallitha S, Rajendran T, Divya B. Evaluation of Ica Gene in Comparison with Phenotypic Methods for Detection of Biofilm Production by Coagulase Negative Staphylococci in a Tertiary Care Hospital. *J Clin Diagn Res.* 2015; 9 (8): 16-19.
24. Skyberg J, Siek K, Doetkott C, Nolan L. Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny. *J Appl Microbiol.* 2007; 102(2): 548-54.

25. Ponnusamy P, Natarajan V, Sevanan M. In vitro biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* and their antimicrobial susceptibility pattern. *Asian Pac JTrop Dis.* 2012; 5(3):210-3.
26. Knobloch JK M, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immun.* 2002; 191(2):101-6.
27. Růžička F, Hola V, Votava M, Tejkalova R, Horvát R, Heroldová M, et al. Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia microbiologica.* 2004; 49(5):596.
28. Oliveira A, Maria de Lourdes R. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes.* 2010;3(1):260.
29. Deka N. Comparison of Tissue Culture plate method, Tube Method and Congo Red Agar Method for the detection of biofilm formation by Coagulase Negative *Staphylococcus* isolated from Non-clinical Isolates. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2014; 3(10):810-5.
30. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis.* 2011; 15(4):305-11.
31. Saxena S, Banerjee G, Garg R, Singh M. Comparative study of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients of lower respiratory tract infection. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(5): 911.
32. Panda PS, Chaudhary U, Dube SK. Comparison of four different methods for detection of biofilm formation by uropathogens. *Indian J Pathol Microbiol.* 2016;59(2):177.