Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 11:55 IRST on Monday January 29th 2018

بررسی تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های بوردتلا پرتوسیس با روش in vitro biofilm formation

نویسندگان: طیبه شهبازی[1]، پرویز اولیا[2]، فرزاد بادمستی[3]، علی بادامچی[3]، پوران بدیری[4]، فرشته شاهچراغی[3*]

۱. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳. گروه باکتری‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
٤. گروه ژنتیک، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: فرشته شاهچراغی E-mail: shahcheraghifereshteh@yahoo.com

دانشور پزشکی

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وپنجم-شماره ۱۳۱
آبان ۱۳۹۶

دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۱۵
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۶/۰۷/۳۰
پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۰۷

چکیده

مقدمه و هدف: بوردتلا پرتوسیس یک باکتری کوکوباسیلِ گرم منفی و عامل سببی بیماری حاد تنفسی سیاه‌سرفه است که شمار مبتلایان به آن در سال‌های اخیر رو به فزونی است. توانایی تولید بیوفیلم به این باکتری در تداخل با سیستم ایمنی میزبان، شدت بیماری و حساسیت آنتی‌بیوتیکی کمک می‌کند. لذا با توجه به اهمیت این فاکتور، در این تحقیق ما توانایی جدایه‌های بوردتلا پرتوسیس را در تشکیل بیوفیلم مورد آزمایش قراردادیم.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های نازوفارنکس افراد مشکوک به سیاه‌سرفه طی سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۵ از سراسر ایران جمع‌آوری و به آزمایشگاه مرجع سیاه‌سرفه در انستیتو پاستور ایران منتقل شدند. باکتری موردنظر از طریق کشت جداسازی شد به‌طوری‌که ما نهایتاً ۲۰ نمونه مثبت داشتیم. درنهایت، آزمایش in vitro biofilm formation را برای سویه‌های جداشده انجام دادیم.

نتایج: ۲۰ نمونه بالینی بوردتلا پرتوسیس که در این مطالعه موردبررسی قرار گرفتند همگی قادر به تشکیل بیوفیلم بودند و نیز با توجه به اینکه OD خوانده‌شده نهایی برای آن‌ها بین ۰/۶۰۶ و ۱/۲۱۲ شد، لذا قدرت بیوفیلم تشکیل‌شده به‌وسیله آن‌ها متوسط است.

نتیجه‌گیری: یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر مشابه تحقیقات انجام‌شده توسط دیگر محققان است که می‌تواند نشان‌دهنده توانایی سویه‌های بوردتلا پرتوسیس در تشکیل بیوفیلم و ایجاد اثرات سوء ناشی از آن بر میزبان باشد، مانند مقاومت آنتی‌بیوتیکی، شدت بیماری و غیره. لذا با توجه به اهمیت این موضوع، نیاز به تحقیقات بیشتر و گسترده‌تری در این زمینه است.

واژگان کلیدی: بوردتلا پرتوسیس، بیوفیلم، in vitro biofilm formation

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 11:55 IRST on Monday January 29th 2018

مقدمه

بوردتلا پرتوسیس یک باکتری کوکوباسیل گرم منفی و عامل بیماری سیاه‌سرفه است(۱،۲). سیاه‌سرفه یا پرتوسیس یک بیماری تنفسی با شدت و حدّت بالاست (۳). این بیماری به‌طورمعمول دارای ٤ مرحله اصلی است. یک دوره انکوباسیون بین ۱ تا ۳ هفته که پس‌ازآن مرحله دوم یعنی کاتارال آغاز می‌شود. این مرحله می‌تواند تا چندین هفته ادامه یابد. مرحله سوم پاروکسیسمال است که مشخصه آن سرفه‌های انقباضی و سرفه‌های معمولی است. این فاز ممکن است با سیانوز و استفراغ همراه باشد و تا ۱۰ هفته طول بکشد. نهایتاً مرحله آخر فاز نقاهت است که به مدت چند هفته ادامه دارد و طی آن شاهد کاهش تدریجی شدت و فراوانی علائم مراحل قبل خواهیم بود (٤). براساس گزارش‌ها به نظر می‌آید سالانه حدوداً ١٦ میلیون مورد ابتلا به سیاه‌سرفه و تقریباً ۱۹۵ هزار مرگ در اثر این بیماری اتفاق می‌افتد(۳،۵). در مورد ایران نیز طبق گزارش‌های ارائه‌شده از مرکز مدیریت بیماری‌ها در ایران (آمار منتشرنشده)، آمار میزان بیماری باوجود پوشش واکسیناسیون حدود ۹۹ درصد در سال‌های اخیر، افزایش‌یافته که می‌تواند ناشی از کاهش ایمنی بدن بعد از واکسیناسیون، انجام ناقص واکسیناسیون، وجود سوش‌های پلی-مورفیک براثر جهش‌های ژنی در آنتی‌ژنهای مرتبط با واکسن و یا عدم کارایی واکسن و نیز پیشرفت در شناسایی و گزارش موارد عفونت، باشد. از سال ۱۳۷۰ تا ۱۳۸۵ شاهد کاهش موارد محتمل بیماری هستیم، درحالی‌که از سال ١٣٨٦ به بعد این روند در کشور افزایش‌یافته است. گرچه در سال‌های اخیر با همکاری مرکز مدیریت بیماری‌ها و آزمایشگاه مرجع کشوری انستیتو پاستور ایران، پیشرفت‌های قابل‌توجهی در عرصه تشخیص و شناسایی بوردتلا پرتوسیس صورت گرفته است (٦).

باکتری یادشده فاکتورهای بیماری‌زایی متعددی را تولید می‌کند که به دودسته کلیِ توکسین‌ها و ادهزین‌ها تقسیم می‌شوند. ازجمله این فاکتورها می‌توان به فیمبریه، پرتاکتین، فیلامنتوس هماگلوتینین و سایتوتوکسین نایی اشاره کرد (۷). از طرفی توانایی تولید بیوفیلم توسط بوردتلا پرتوسیس به‌ویژه در مسیرهای تنفسی، می‌تواند پیامدهای متفاوتی همچون افزایش بقای باکتری در بدن میزبان را در پی داشته باشد. در ساختار بیوفیلم تولید اگزوپلی‌ساکاریدها افزایش‌یافته و به‌تبع این پدیده به‌نوعی افزایش اندازه کپسول باکتری رخ می‌دهد که منجر به حفاظت بیشتر از آن در برابر میزبان می‌شود (۸). درواقع بیوفیلم به تجمعات چند سلولی میکروبیِ متصل به سطح اطلاق می‌شود که اغلب به‌وسیله یک ماتریکسِ خودساخته یا مشتق شده از میزبان محصور است و عمدتاً با بیماری-زایی، استقامت در برابر فشارهای محیطی، سیستم ایمنی میزبان و مواد ضدمیکروبی ارتباط دارد (۹). به عبارتی از بیوفیلم به‌عنوان عامل مهم مزمن شدن بیماری‌های باکتریایی یاد می‌شود و از باکتری در برابر هر دو نوع ایمنی ذاتی و اکتسابیِ میزبان حفاظت می‌کند (۱۰).

توسعه بیوفیلم یک فرآیند چندمرحله‌ای است که از اتصال باکتری به سطح آغازشده و با شکل‌گیری کلنی‌های کوچک ادامه می‌یابد تا درنهایت یک ساختار ۳ بعدی منظم ایجاد شود (۱۰). عوامل مختلفی در شکل‌گیری بیوفیلم بوردتلا پرتوسیس نقش دارند که از آن دسته می‌توان به این موارد اشاره کرد: سیستم انتقال سیگنال BvgAS (نقش در شکل‌گیری بیوفیلم)، فاکتورهای پروتئینی تنظیم‌کننده bvgAS (نقش در توسعه بیوفیلم)، فلاژل (به‌عنوان ساختار سطحی ممانعت کننده از Bvg، نقش در شکل‌گیری بیوفیلم)، ترکیبات ماتریکس (نقش در شکل‌گیری بیوفیلم) و لوکوس bpsA-D (۹).

جهت بررسی تشکیل بیوفیلم توسط یک باکتری از روش‌های مختلف فنوتیپی و ژنوتیپی استفاده می‌شود که برخی از این روش‌ها به مطالعه این پدیده در داخل بدن (in vivo) و برخی در خارج از بدن (in vitro) می‌پردازند. ازجمله فن‌هایی که توسط آن‌ها می‌توان تشکیل و یا عدم تشکیل و نیز تحلیل محتوای یک

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 11:55 IRST on Monday January 29th 2018

بیوفیلم را در شرایط ساکن و خارج از بدن موردتحقیق قرارداد می‌توان به روش میکروتیتر پلیت، رابط هوا-مایع (ALI) و سنجش کلنی بیوفیلم اشاره کرد که دراین‌بین روش اول یعنی استفاده از میکروتیتر پلیت یک تکنیک با مراحل انجام واضح‌تر و روشن‌تر است که توسط بسیاری از محققان در زمینه بیوفیلم و در مورد بسیاری از باکتری‌ها مورداستفاده قرارگرفته است (۱۱).

در پژوهش حاضر ما به جهت اهمیت موضوع تشکیل بیوفیلم توسط بوردتلا پرتوسیس و اثرات احتمالیِ آن بر میزبان و از این نظر که علیرغم اهمیت افزایش‌یافته این بیماری در سال‌های اخیر مطالعات کمی در مورد جوانب مختلف آن صورت گرفته است، بر آن شدیم تا توانایی سویه‌های موردمطالعه از این باکتری را به روش in vitro biofilm formation و با استفاده از میکروتیتر پلیت موردسنجش قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری

در شرایط استریل و ایمن (با استفاده از هود کلاس ۲ به همراه دستکش و ماسک)، سوآب داکرون‌های موجود در محیط انتقالی (ارسال‌شده از سراسر کشور به آزمایشگاه مرجع کشوری سیاه‌سرفه در انستیتو پاستور ایران) روی محیط کشت رگان لو (اختصاصی بوردتلا) کشت داده شدند. پلیت‌ها را در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد همراه با رطوبت قرار داده و نهایتاً تا ۱۰ روزبه باکتری‌های احتمالی فرصت رشد دادیم. در صورت رشد کلنی خالص و مشکوک (کلنی‌های کوچک، براق، نقره‌ای‌رنگ)، ابتدا از آن‌ها روی لام گسترش تهیه‌کرده و پس از رنگ‌آمیزی گرم، ازنظر وجود کوکوباسیل‌های گرم منفی بررسی کردیم (مشاهده با عدسی ۱۰۰) (۱۲).

تأیید هویت باکتری

کلنی‌های مشکوک را با استفاده از تست اکسیداز، کاتالاز، کیت API20E (biomerieux Marcy-I'Etoile، فرانسه) و آگلوتیناسیون اسلایدی با آنتی‌سرم (Difco, USA) بررسی کردیم که توسط آن‌ها تأیید نهایی باکتری صورت گرفت(۱۳،۱٤).

درنهایت از میان تمامی نمونه‌های مشکوک سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۵، تعداد ۲۰ نمونه مثبت ازنظر بوردتلا پرتوسیس تأیید شد.

بررسی تشکیل بیوفیلم

با استفاده از محیط مایع غنی اختصاصی جنس بوردتلا با عنوان SS broth (Stainer Scholte broth) استریل، یک سوسپانسیون از باکتری با کدورتی در حد نیم مک‌فارلند (به‌طوری‌که در طول‌موج ٦۰۰ نانومتر دارای OD تقریباً برابر با ۰/۱ باشد) درست کردیم. ۲۰۰ لاندا از سوسپانسیون حاصل از هر نمونه را در چاهک-های میکروپلیت استریل ۹٦ خانه‌ای تزریق کردیم (جهت اطمینان از نتیجه کار برای هر نمونه در ۳ چاهک سوسپانسیون ریخته شد). روی چاهک‌ها را پوشانده و به مدت ۹٦ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قراردادیم. پس از گذشت زمان یادشده ۲۰ دقیقه پلیت را آرام شیک کرده و با آب مقطر استریل شست‌وشو دادیم. ۲۰۰ لاندا رنگ کریستال ویوله ۰/۱٪ افزوده و پس از ده دقیقه شست‌وشو دادیم. جهت ثابت کردن سلول‌های رنگ‌شده ۲۰۰ لاندا اتانول ۹٦ درصد به چاهک‌ها اضافه کردیم. درنهایت با الایزاریدر و در طول‌موج ٥٤۰ نانومتر OD ها را خواندیم (۱۵). نتایج بر اساس جدول شماره ۱ تفسیر شدند.

جدول ۱. دسته‌بندی توانایی تشکیل بیوفیلم(۱۶)

نتیجه	محاسبه میزان حدنصاب	نتایج حاصل از میانگین OD
عدم تشکیل بیوفیلم	OD≤ODc	OD≤۰/۳۰۳
تشکیل بیوفیلم به‌صورت ضعیف	ODc<OD≤۲ODc	۰/۳۰۳<OD≤۰/۶۰۶
تشکیل بیوفیلم به‌صورت متوسط	۲ODc<OD≤۴ODc	۰/۶۰۶<OD≤۱/۲۱۲
تشکیل بیوفیلم به‌صورت قوی	OD>۴ODc	OD>۱/۲۱۲

در جدول شماره ۱، ODc برابر با حاصل جمع OD میانگین نمونه کنترل منفی و ۳ برابرِ SD نمونه‌ها (انحراف معیار) است که به‌عنوان OD cut off محسوب می‌شود (۱٦).

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 11:55 IRST on Monday January 29th 2018

به‌عنوان کنترل مثبت از سویه بوردتلا پرتوسیس استاندارد Tohama1 و برای کنترل منفی از محیط کشت SS broth بدون حضور باکتری و به‌تنهایی استفاده کردیم.

نتایج

براساس جدول شماره ۱، تمامی سویه‌های بوردتلا پرتوسیس موردمطالعه، قادر به تشکیل بیوفیلم به شکل متوسط بودند. درواقع همان‌طور که در جدول شماره ۲ نشان داده‌شده است، تمامی میانگین OD های خوانده برای ۲۰ سویه موردبررسی، اعدادی بین ۰/۶۰۶ و ۱/۲۱۲ بودند.

جدول ۲. میانگین OD های نمونه‌های بیماران

سویه‌ها	OD میانگین	تفسیر
۲۰ سویه بالینی موردمطالعه	۱/۲۱۲<OD≤۰/۶۰۶	تشکیل بیوفیلم به شکل متوسط
Tohama1 (کنترل مثبت)	۲/۲۱۵	تشکیل بیوفیلم به شکل قوی
کنترل منفی	۰/۰۶	عدم تشکیل بیوفیلم

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر که بر اساس روش in vitro biofilm formation و با استفاده از میکروپلیت تیتر انجام‌شده است، تمامی سویه‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم به شکل متوسط بودند. این تحقیق در مورد بوردتلا پرتوسیس برای اولین بار است که در ایران انجام می‌شود بنابراین پیشینه اطلاعاتی در ایران ندارد، اما در قیاس با مطالعات انجام‌گرفته در دیگر کشورها می‌توان گفت که در پژوهشی که توسط Arnal و همکاران (۲۰۱۵) و با روشی مشابه پژوهش حاضر صورت گرفت، مشخص گردید که سویه‌های موردبررسی همگی قادر به تشکیل بیوفیلم هستند با این تفاوت که فرم شکل‌گیری بیوفیلم در آن‌ها قوی بود. در بررسی بعدی در همین مطالعه مشخص شد که سویه‌های موردبررسی همگی دارای جهشی در ژن bvgS بودند که به نظر می‌آید در افزایش سرعت و میزان اتصال باکتری به سطوح مؤثر است و احتمالاً در این یافته که باکتری‌ها قویاً بیوفیلم تشکیل داده‌اند مؤثر باشد (۱۷). Bosch و همکاران (۲۰۰۶) در آزمایش in vitro biofilm formation که با استفاده از میکروسکوپ الکترونی به مشاهده مستقیم اتصالات برقرارشده پرداختند، نشان دادند که همه‌سویه‌های موردبررسی قادر به تشکیل اتصالات محکم بیوفیلمی هستند (۸). Conover و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه خود که براساس آزمایش‌های in vivo روی موش انجام شد، نشان دادند که سویه‌های موردبررسی روی دیواره نازال موش ایجاد بیوفیلم می‌کنند و نیز مشخص گردید که با ایجاد موتاسیون در ژن مؤثر در ایجاد بیوفیلم مانند ژن‌های لوکوس bps، شکل‌گیری بیوفیلم دچار اختلال می‌شود (۱۸). در تحقیق Dorji و همکاران (۲۰۱۶) که سنجش in vitro biofilm formation با استفاده از میکروتیتر پلیت روی ۲۱ سویه بالینی بوردتلا پرتوسیس انجام شد، مشخص گردید که همه سویه‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم به شکل قوی هستند (۱۵). در پژوهش Mishra و همکاران (۲۰۰۵) که روی سویه‌ها استاندارد بوردتلا و با استفاده از میکروتیتر پلیت جهت سنجش تشکیل بیوفیلم انجام شد، نشان داده شد که با استفاده از این روش تشکیل بیوفیلم به‌خوبی قابل تشخیص است (۱۹). Parise و همکاران (۲۰۰۷) نیز با استفاده از روش مورد تحقیق حاضر موفق به سنجش بیوفیلم در سویه‌های استاندارد باکتریایی شدند و پس‌ازآن با استفاده از سنجش‌های مرتبط با میکروسکوپ الکترونی و ایجاد موتاسیون‌های ژنی، نقش لوکوس bpsA-D را در تشکیل بیوفیلم تأیید کردند (۱۰). Sugisaki و همکاران (۲۰۱۳) به جهت ارزیابی بیوفیلم سویه‌های استاندارد، از پلیت ۱۲ خانه‌ای با لامل استفاده کردند و پس از خواندن چگالی نوری از لامل جهت مشاهده بیوفیلم‌ها با میکروسکوپ الکترونی استفاده کردند (۲۰).

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 11:55 IRST on Monday January 29th 2018

مطالعه حاضر به جهت قدرت تشکیل بیوفیلم در سویه‌های مورد مطالعه، مطابق تحقیقات مشابه در خارج از کشور است، اما به جهت اختلافی که در فرم تشکیل بیوفیلم (ضعیف، متوسط و قوی) وجود دارد علت قاطعی نمی‌توان ذکر کرد چراکه قطعاً به بررسی‌های دقیق‌تری دارد و به‌ویژه به‌این‌علت که اولین بار در ایران است که چنین آزمایشی در مورد بوردتلا پرتوسیس انجام می‌شود و به‌تبع آن اولین بار است که از محیط پیچیده‌ای به نام SS broth استفاده می‌شود که ساخت آن نیازمند مهارت و زمان زیادی است، قطعاً جهت پی بردن به علت اختلاف سویه‌ها در فرم تشکیل بیوفیلم، باید جوانب مختلفی مورد بررسی و تحقیق گیرند، از جمله شرایط رشد باکتری در محیط مایع غنی (به جهت پیچیدگی ساخت این محیط)، موتاسیون‌های ژنی سویه‌ها در ژن‌های مربوطه و غیره. بدین ترتیب بهتر است این آزمایش با روش‌های دیگری که قبلاً ذکر آن گذشت و یا در مقالات مربوطه یافت می‌شود، تکرار شود تا نتایج حاصل از این روش با روش‌های دیگر قابل قیاس باشد.

درهرحال بر اساس تحقیقات گذشته به نظر می‌رسد زمانی که محقق صرفاً می‌خواهد تشکیل و یا عدم تشکیل بیوفیلم و نیز فرم تشکیل آن (ضعیف، متوسط و قوی) را موردسنجش قرار دهد، استفاده از روش میکروتیتر پلیت روشی مناسب و کارا است؛ اما زمانی که بحث عوامل مؤثر بر تولید و توسعه بیوفیلم مطرح است باید در کنار روش فوق، از روش‌هایی که بر پایه مشاهده با میکروسکوپ الکترونی و تکنیک‌های مشابه است استفاده شود.

در نهایت می‌توان گفت همان‌طور که پیش‌ازاین مطرح شد بر اساس تحقیق حاضر مشخص گردید که تمامی سویه‌های بوردتلا پرتوسیس جداشده از بیماران قادر به تشکیل بیوفیلم هستند. این یافته هم می‌تواند به‌نوعی با شدت و عوارض بیماری ارتباط پیدا کند (۸) و هم اینکه شاید بتوان مقاومت آنتی‌بیوتیکی گزارش‌شده اخیر این باکتری در ایران (۲۱) و نیز در خارج از کشور را (۲۲) به موضوع بیوفیلم ربط داد. لذا با توجه به اهمیت بالای بیوفیلم باکتریایی و نیز با عنایت به اینکه مطالعه حاضر برای اولین بار است که در ایران انجام می‌شود و روش‌های متعدد دیگری نیز در مورد ارزیابی بیوفیلم وجود دارد، قطعاً نیازمند تحقیقات گسترده‌تری دراین‌باره هستیم. در گام بعدی نیز می‌توان با دست‌کاری‌های ژنتیکی در ژن‌هایی که به نظر می‌آید مسئول تولید و توسعه بیوفیلم هستند، بر نقش آن‌ها صحه گذاشت و یا رد کرد. از طرفی طبق آنچه در باب تحقیقات دیگر محققان موجود است، مشخص است که غالب آن‌ها بیشتر به موضوع ژن‌های دخیل در تشکیل و توسعه بیوفیلم پرداخته‌اند و به میزان کمتر در مورد فراوانی سویه‌های بالینی بوردتلا پرتوسیس قادر به تشکیل بیوفیلم، مطالعه شده است. به همین علت قطعاً این موضوع به تحقیقات بیشتری نیاز دارد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد مصوب گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد است.

هم‌چنین از مساعدت و همکاری کارمندان و محققان آزمایشگاه مرجع کشوری سیاه‌سرفه در بخش باکتری-شناسی انستیتو پاستور ایران، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

1. Brooks GF, Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. 26 th. Vol. 53, New York : McGraw-Hill Medical ; London : McGraw-Hill [distributor]. New York 2013; 877 .
2. Sealey KL, Belcher T, Preston A. Bordetella pertussis epidemiology and evolution in the light of pertussis resurgence. Infection, Genetics and Evolutio 2016;40:136–43.
3. Hegerle N. Epidemiology of whooping cough and typing of Bordetella pertussis. Future Microbiology 2013;8(11):1391–403.
4. Locht C. Pertussis: Where did we go wrong and what can we do about it? J Infect. 2016;
5. National Center for Immunization and Respiratory Diseases Pertussis (whooping cough), Fast Facts Centers for Disease Control and Prevention [Internet] 2015. Available from: https://www.cdc.gov/pertussis/fast-facts.html

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 11:55 IRST on Monday January 29th 2018

6. Shahcheraghi F, NakhostLotfi M, Parzadeh M, Nikbin VS, Shouraj F, Zahraei SM. Isolation of Bordetella Pertussis and Bordetella Parapertussis of Clinical Specimens from Different Provinces of Iran 2012;22(88):2–8.
7. Fedele G, Bianco M, Ausiello CM. The virulence factors of bordetella pertussis: Talented modulators of host immune response. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz) 2013;61(6):445–57.
8. Bosch A, Serra D, Prieto C, Schmitt J, Naumann D, Yantorno O. Characterization of Bordetella pertussis growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. Applied Microbiology and Biotechnology 2006;71:736–47.
9. Cattelan N, Dubey P, Arnal L, Yantorno OM, Deora R. Bordetella Biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. Pathogens and Disease 2015.
10. Parise G, Mishra M, Itoh Y, Romeo T, Deora R. Role of a putative polysaccharide locus in Bordetella biofilm development. Journal of Bacteriology 2007;189(3):750–60.
11. Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA. Growing and Analyzing Static Biofilms. Current Protocols in Microbiology 2005;1(Unit 1B.1).
12. Loeffelholz MJ, Thompson CJ, Long KS, Gilchrist MJR. Comparison of PCR, culture, and direct fluorescent-antibody testing for detection of Bordetella pertussis. Journal of Clinical Microbiology 1999;37(9):2872–6.
13. Müller FMC, Hoppe JE, Wirsing Von König CH. Laboratory diagnosis of pertussis: State of the art in 1997. Journal of Clinical Microbiology 1997;35(10):2435–43.
14. Sedaghat M, Lotfi MN, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Status of pertussis in Iran. Jundishapur Journal of Microbiology 2014;7(11).
15. Dorji D, Richmond P, Keil A, Mukkur T. Biofilm forming potential and antimicrobial susceptibility of newly emerged Western Australian Bordetella pertussis clinical isolates. Biofouling 2016;32(9):1141–52. 16.
16. Badmasti F, Siadat SD, Bouzari S, Ajdary S, Shahcheraghi F. Molecular detection of genes related to biofilm formation in multidrug-resistant Acinetobacter baumannii isolated from clinical settings. Journal of Medical Microbiology 2015;64(Pt 5):559–64.
17. Arnal L, Grunert T, Cattelan N, De Gouw D, Villalba MI, Serra DO, et al. Bordetella pertussis isolates from argentinean whooping cough patients display enhanced biofilm formation capacity compared to Tohama I reference strain. Frontiers in Microbiology 2015;6.
18. Conover MS, Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Deora R. The Bps polysaccharide of Bordetella pertussis promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. Molecular Microbiology 2010;77(6):1439–55.
19. Mishra M, Parise G, Jackson KD, Daniel J, Wozniak DJ, Deora R. The BvgAS Signal Transduction System Regulates Biofilm Development in Bordetella. Journal of Bacteriology 2005;187(4):1474–84.
20. Sugisaki K, Hanawa T, Yonezawa H, Osaki T, Fukutomi T, Kawakami H, et al. Role of (p)ppGpp in biofilm formation and expression of filamentous structures in Bordetella pertussis. Microbiology 2013;159:1379–89.
21. Mirzaei B, Bameri Z, Babaei R, Shahcheraghi F. Isolation of high level macrolide resistant Bordetella pertussis without transition mutation at domain V in Iran. Jundishapur Journal of Microbiology 2015;8(7):e18190.
22. Guillot S, Descours G, Gillet Y, Etienne J, Floret D, Guiso N. Macrolide-resistant bordetella pertussis infection in newborn girl, France. Emerging Infectious Diseases 2012;18(6):966–8.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 11:55 IRST on Monday January 29th 2018

Daneshvar

Medicine

An investigation of biofilm formation in *Bordetella Pertussis* isolates by *In vitro* biofilm formation method

Tayebe Shahbazi[1], Parviz Owlia[2], Farzad Badmasti[3], Ali Badamchi[3], Pouran Badiri[4], Fereshteh Shahcheraghi[3*]

1. Department of Microbiology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
2. 2. Molecular Microbiology Research Center, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
3. 3. Department of Bacteriology, Pasteur institute of Iran, Tehran, Iran.
4. 4. Departement of Genetics, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[*]**Corresponding author e-mail: shahcheraghifereshteh@yahoo.com**

Abstract

Background and Objective: *Bordetella pertussis* is a gram-negative cocobacilli bacterium and etiologic agent of whooping cough that in recent years, the number of its cases is on the rise. The ability of biofilm production helps this bacterium in interference with host immune system, severity of illness and antibiotic sensitivity. Thus, due to the importance of this factor, in this investigation, we tested the ability of *Bordetella pertussis* isolates in biofilm formation.

Materials and Methods: Nasopharyngeal samples were collected from persons who suspected whooping cough from throughout of Iran from 2014 to 2016 and were transferred to pertussis reference laboratory in Pasteur Institute of Iran. The bacterium in question was isolated by culture so that finally we had 20 positive samples. At the end, we performed *in vitro* biofilm formation test for isolated strains.

Results: All of the 20 clinical samples of *Bordetella pertussis* which in this study were examined could form biofilm and their final OD became between 0.606 and 1.212, the power of the biofilm made by them was intermediate.

Conclusion: Findings of this study was similar to researches conducted by other researchers, which showed the ability of the strains of *Bordetella pertussis* to form biofilm and to create adverse effects on the host for example antibiotic resistance, illness severity, and so on. Thus, considering the importance of this issue, more and broader researches are needed in this area.

Keywords: *Bordetella pertussis*, Biofilm, I*n vitro* biofilm formation.

Scientific-Research Journal of Shahed University 25th Year, No.131
October- November 2017

Received: 06/09/2017
Last revised: 22/10/2017
Accepted: 29/10/2017

Daneshvar(medicine) shahed University/ 25th year/2017 /NO.131

Archive of SID

www.SID.ir