Archive of SID

Original Article

Determination of bacteria in gallbladder of patients with cholelithiasis and evaluation of pathogenic factors of the prevalent isolated bacteria

***Parastoo Ehsani (Ph.D)**, Corresponding Author, Ph.D in Biological Products, Associate Professor, Department of Molecular Biology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. **E-mail: p_ehsani@yahoo.com** ORCID ID: 0000-0003-3592-2008

Fateme Farahany (M.Sc), Microbiologist, Department of Molecular Biology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-7010-2964

Negar Daeizadeh (M.Sc), M.Sc in Biotechnoloy, Department of Molecular Biology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-6616-007X

Melika Amya (M.Sc), Microbiologist, Department of Molecular Biology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0001-9810-9247

Moein Saleh (M.Sc), M.Sc in Microbial Biotechnology, Department of Molecular Biology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0001-8487-815X

Mina Ebrahimi-Rad (Ph.D), Ph.D in Medical Biotechnology, Assistant Professor , Department of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-4208-2206

Karamollah Toolabi (M.D), Associate Professor, Department of Laparoscopic Surgery, Imam Khomeini Hospital, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-7354-5349

Downloaded from goums.ac.ir at 13:54 +0430 on Sunday September 8th 2019

Abstract

Background and Objective: Various infections and the formation of stones could be the cause for bile duct obstruction of that sterile organ. Determination of pathogenesis factors and the bacteria involved in infections are important in the prevention of disease, and cares needed following surgery. This study was done to determine the bacteria in the gallbladder of patients with cholelithiasis and evaluation of pathogenic factors of the prevalent isolated bacteria.

Methods: In this descriptive laboratory study, 35 samples of gallbladder tissues which contained gallstones were collected under sterile conditions in "Department of General Surgery of Imam Khomeini Hospital", Tehran, Iran during 2016. The stone types were analyzed and decomposed by chemical procedures, and the bacteria existed in the tissues were also identified using biochemical experiments. The tissues with negative results in microbiological studies were looked for any contaminating bacteria, applying the DNA extracted from gallbladder tissue as a template using F27 and R1492 as the primers for PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification of 16SrRNA gene. Those with the positive results of microbiological tests were subjected to the DNA sequencing following gel purification and blasted against the NCBI gene database. The most frequently isolated bacteria were studied according to the intensity of biofilm formation, using the microtitre plate method. *CsgF* and *Ag43 (Flu)*, the genes involved in the induction of such phenotype were also analyzed in this study. The antibiotic resistance assay of the isolates was performed using disc diffusion procedure.

Results: Thirteen out of thirty five samples of post-surgery gallbladder tissues were found to be infected by different bacteria, including: *Klebsiella* (3 cases), *Escherichia coli* (4 cases), *Enterobacter* (1 case), *Staphylococcus aureus* (2 cases), *Enterococci* (2 cases), and *Streptococcus* (1 case). In 23 out of 35 samples (65.7%), no bacteria could be isolated using microbiological methods. However, in seven out of 23 samples, the amplified 16SrRNA had an indication of *Klebsiella* (6 cases) and *Enterococcus* (1 case) isolates. Therefore, the most prevalent genus in gallbladder infections was *Klebsiella* (47.36%). Chemical analysis showed that the highly frequent compound of gallstones (98%) were of cholesterol and bilirubin. *Escherichia coli* with fourcases were the highest culture growing isolated bacteria, in all of which, the biofilm formation genes were present. In the two out of four *Escherichia coli* isolates the intensity of biofilm formation was high. Although, in the remaining two isolates was medium. While, they were found to be sensitive to the most of the antibiotics, they showed resistance to Tetracycline, Ciprofloxacin and Ceftazidime in different ranges.

Conclusion: The present study provided evidence that non-cultural bacteria are hihly present in gallbladder infections. The high potential of the commonly isolated bacteria in biofilm formation should be taken as a warning to follow the precise protocol of antibiotic prescription for treatment of gallbladder infections.

Keywords: Choelitiasis, Entrobacteriace, Biofilm, Polymerase Chain Reaction

Received 22 Jul 2018 **Revised** 2 Sep 2018 **Accepted** 9 Sep 2018

Cite this article as: Parastoo Ehsani, Fateme Farahany, Negar Daeizadeh, Melika Amya, Moein Saleh, Mina Ebrahimi-Rad, Karamollah Toolabi. [Determination of bacteria found in gallbladder of patients with cholelithiasis and evaluation of pathogenic factors of the prevalent isolated bacteria]. J Gorgan Univ Med Sci. 2019 Autumn; 21(3): 120-128. [Article in Persian]

www.SID.ir

Archive of SID

تحقیقی

شناسایی باکتری‌های موجود در صفرای بیماران مبتلا به مشکلات صفراوی و بررسی تولید بیوفیلم در جدایه‌های شایع

*** دکتر پرستو احسانی**، دکتری فراورده های بیولوژیک، دانشیار، بخش بیولوژی مولکولی باکتری‌ها، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران. ORCID ID: 0000-0003-3592-2008
فاطمه فراهانی، کارشناسی ارشد میکروبشناسی، بخش بیولوژی مولکولی باکتری‌ها، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران. ORCID ID: 0000-0002-7010-2964
نگار دایی زاده، کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، بخش بیولوژی مولکولی باکتری‌ها، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران. ORCID ID: 0000-0002-6616-007X
ملیکا امیا، کارشناسی ارشد میکروبشناسی، بخش بیولوژی مولکولی باکتری‌ها، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران. ORCID ID: 0000-0001-9810-9247
معین صالح، کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، بخش بیولوژی مولکولی باکتری‌ها، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران. ORCID ID: 0000-0001-8487-815X
دکتر مینا ابراهیمی راد، دکتری بیوتکنولوژی پزشکی، استادیار، بخش بیوشیمی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران. ORCID ID: 0000-0002-4208-2206
دکتر کرم الله طولابی، جراح، دانشیار، بخش جراحی لاپاراسکوپی، بیمارستان امام خمینی، تهران، ایران. ORCID ID: 0000-0002-7354-5349

چکیده

زمینه و هدف: *عفونت‌های مختلف در سیستم مجاری صفراوی و تشکیل سنگ از عوامل انسداد جریان صفرا در آن ارگان استریل است. این مطالعه به منظور شناسایی باکتری‌های موجود در صفرای بیماران مبتلا به مشکلات صفراوی و بررسی تولید بیوفیلم در جدایه‌های شایع انجام شد.*

روش بررسی: *این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی روی ۳۵ نمونه (سنگ و بافت صفرا) جمع‌آوری شده در شرایط استریل (به روش لاپاراسکوپی) از بخش جراحی بیمارستان امام خمینی تهران طی شش‌ماه اول سال ۱۳۹۵ انجام شد. نوع سنگ‌ها به‌کمک روش‌های شیمیایی و نوع میکروب‌ها با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی و مولکولی تعیین شدند. برای جستجوی باکتری‌ها در نمونه‌های منفی، DNA از بافت کیسه صفرا تخلیص شد و با استفاده از پرایمرهای 1492R و27 F برای تکثیر قطعه‌ای از ژن 16SrRNA الگو قرار گرفت. نوع باکتری در نمونه‌های مثبت به‌کمک بانک اطلاعاتی NCBI تعیین شد. شایع‌ترین جدایه از لحاظ شدت تولید بیوفیلم به‌کمک روش میکرو تیترپلیت و ژن‌های درگیر این فنوتیپ (Ag43(Flu و CsgF به‌روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن تعیین گردید.*

یافته ها: *تعداد ۱۳ نمونه دارای انواع باکتری شامل ۳ جدایه کلبسیلا، ٤ جدایه اشریشیا کلی، یک جدایه انتروباکتر، ۲ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس، ۲ جدایه انتروکوک و یک جدایه استرپتوکوکوس بودند. از ۲۳ مورد نمونه صفرا، در ٦٥/٧ درصد موارد بااستفاده از روش کشت میکروبیولوژیک، باکتری جدا نگردید؛ ولی هفت باکتری شامل شش سویه کلبسیلا و یک انتروکوک با استفاده از تکثیر 16SrRNA و تعیین ترادف شناسایی شدند. بنابراین، در مجموع گونه کلبسیلا (٤٧/٣٦ درصد) بیشترین سهم را در عفونت‌های کیسه صفرا نشان داد. ترکیبات کلسترولی و بیلی‌روبینی در ۹۸درصد نمونه‌های حاوی سنگ دیده شد. با وجود آن که وفور کلبسیلا در عفونت‌های کیسه صفرا (٤٧/٣٦ درصد) بیش از بقیه باکتری‌ها بود. بیشترین باکتری قابل کشت اشریشیا کلی بود. کلیه اشریشیا کلی‌های مورد بررسی دارای ژن‌های عامل ایجاد بیوفیلم بودند؛ ولی شدت تشکیل بیوفیلم در دو مورد از آنها قوی و در دو مورد دیگر متوسط بود. این باکتری‌ها نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بودند و به تتراسیکلین، سیپروفلوکسازین و سفتی زیدیم مقاومت‌های متفاوتی را نشان دادند و به تتراسیکلین مقاوم‌تر بودند.*

نتیجه‌گیری: *باکتری‌های غیرقابل کشت سهم مهمی در عفونت‌های کیسه صفرا دارند. توانایی بالای ایجاد بیوفیلم در باکتری‌های شایع جداشده هشداری برای مداقه در تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها برای از بین بردن این بیوفیلم‌های عفونی در عفونت‌های کیسه صفرا را نشان می‌دهد.*

کلید واژه‌ها: *سنگ صفراوی ، آنتروباکتریاسه ، بیوفیلم ، Polymerase Chain Reaction*

* نویسنده مسؤول : دکتر پرستو احسانی ، پست الکترونیکی p_ehsani@yahoo.com
نشانی : تهران، خیابان فروردین، پلاک ۶۹، بخش بیولوژی مولکولی انستیتو پاستور ایران، تلفن ۶۴۱۱۲۲۱۹-۰۲۱

وصول مقاله: ۱۳۹۷/٤/۳۱ ، اصلاح نهایی: ۱۳۹۷/٦/۱۱ ، پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/٦/۱۸

مقدمه

صفرا در افراد سالم استریل و فاقد هر گونه باکتری است. وجود میکروارگانیسم‌ها در صفرای انسان می‌تواند نشانه‌ای از وجود یک مشکل بالینی باشد که در اغلب موارد با بیماری کوله لیتیازیس (Cholelithiasis) (حضور سنگ در صفرا) همراه است (۱). شناسایی میکروارگانیسم‌های دخیل در ایجاد این بیماری‌ها و

www.SID.ir

Downloaded from goums.ac.ir at 13:54 +0430 on Sunday September 8th 2019

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 13:54 +0430 on Sunday September 8th 2019

ارزیابی وضعیت مقاومت دارویی آنها می‌تواند کمک شایانی به پزشکان برای تشخیص عوارض بیماری یا کنترل آنها نماید (۲). عفونت‌های مجاری صفراوی اغلب منشا اندوژن دارند. در ایران مطالعات زیادی در رابطه با نقش باکتری‌ها در ایجاد عفونت‌های مجاری صفراوی صورت نگرفته است. نتایج حاصله از مطالعات موجود تا حدودی ارتباط فلور دستگاه گوارش را در بروز این بیماری‌ها مورد توجه قرار می‌دهد. حضور لایه‌های باکتری بر روی سنگ‌های صفراوی و اثرات سینرژیسم در بیماری‌زایی، اهمیت بررسی این سنگ‌ها (۳) را در کیسه صفرا نشان می‌دهد. عموماً سنگ‌های صفراوی از رسوب املاح و پسماندهای صفراوی حاصل می‌گردند که به دو دسته سنگ‌های صفراوی پیگمانته و کلسترولی طبقه‌بندی می شوند. سنگ‌های کلسترولی از بیش از ۵۰ درصد کریستال‌های منو هیدراته کلسترولی به همراه ماتریکس گلیکوپروتئینی و هسته بیلی‌روبینات کلسیم تشکیل یافته‌اند (۴). در مقابل سنگ‌های پیگمانته قهوه‌ای و سیاه به ترتیب از نمک‌های کلسیمی بیلی‌روبین و کنژوگه، اسیدهای صفراوی و دکنجوگه و مقادیر متفاوتی از کلسترول و اسیدهای چرب اشباع بلند زنجیره و بیلی‌روبینات کلسیم تشکیل شده‌اند (۴). حدود ۸۰ درصد سنگ‌های کیسه صفرا به‌طور عمده از نوع کلسترولی و ۲۰ درصد آنها مربوط به سنگ‌های رنگدانه‌ای (پیگمانته) هستند که به‌خصوص در آسیایی‌ها شایع بوده و اغلب با عفونت سیستم صفراوی همراه است (۵).

شیوع شکل‌گیری سنگ‌های صفراوی در ایران براساس یافته‌های سونوگرافی به‌طور متوسط در زنان و مردان به ترتیب در حدود ۱۲ درصد و ۵ درصد است. این فراوانی در قومیت‌های مختلف متفاوت بوده و تحت تاثیر عوامل خطری همچون سن، جنسیت، موتاسیون‌های ژنی، بارداری، چاقی، چربی خون، بیماری‌های زمینه‌ای، مصرف دارو و عفونت‌های میکروبی است (۶). اکثراً عفونت سیستم مجاری صفراوی و کیسه صفرا مرتبط با انسداد جریان صفرا به علت سنگ است. یکی از شایع‌ترین روش‌های درمان برداشتن کیسه صفرا است. یکی از دغدغه‌های جراحان دستگاه گوارش، عفونت پس از عمل و راه‌های پیشگیری از آن است (۷). وجود باکتری در صفرا می‌تواند بر میزان عفونت پس از عمل جراحی اثر بگذارد و حتی این امر پس از جراحی لاپاراسکوپیک نیز مشاهده می‌شود. اگرچه در صورت لاپاراسکوپی شانس عفونت زخم و محل جراحی کمتر از جراحی باز است؛ اما تشکیل آبسه در هر دو روش یکسان است (۸).

عوامل بیماری‌زای باکتری‌ها شامل پیلی فیمبریه فلاژل و همچنین تشکیل بیوفیلم است که این عوامل اثر مهمی بر تشکیل سنگ صفرا دارند (۳و۶). تشکیل بیوفیلم شامل مراحل مختلفی است. ساختارهای سطحی باکتری شامل پروتئین کرلی، فلاژل، پیلی و اگزوپلی ساکارید از آن جمله است. پروتئین کرلی که در اتصال به سطح، اتصال سلول‌ها به یکدیگر و همچنین در مرحله ابتدایی تشکیل بیوفیلم نقش دارد؛ اولین بار در اواخر دهه ۱۹۸۰ در سویه‌های اشریشیا کلی یافت شدند. پروتئین کرلی در شکل‌گیری بیوفیلم در دو باکتری اشریشیا کلی و سالمونلا تیفی موریوم نقش اساسی دارد (۹) سویه‌های تولید کننده پروتئین کرلی نسبت به سویه‌های فاقد آن، مورفولوژی متفاوتی از بیوفیلم را نشان می‌دهند. به‌طوری که سویه‌های فاقد پروتئین کرلی یک بیوفیلم صاف ایجاد می‌کنند. تولید پروتئین کرلی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در داخل بیوفیلم رخ می‌دهد. در حالی که در پلیت‌های آگار و محیط‌های LB تنها در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد تولید می‌شود (۱۲-۹). حداقل شش پروتئین نسخه‌برداری شده از اپرون‌های csgBA و csgDEFG برای تولید پروتئین‌های کرلی شناخته شده است. اپرون csgBA زیرواحد ساختاری اصلی را تولید می‌کند که شامل csgA و csgB است. پروتئین csgB در تجمع واحدهای csgA در سطح باکتری نقش دارد (۱۵-۱۳). اپرون csgDEFG چهار پروتئین فرعی کد می‌کند که در تجمع این پروتئین‌ها نقش اساسی دارند. CsgD یک تنظیم کننده مثبت برای اپرون csgBA محسوب می‌شود. نقش CsgE، CsgF و CsgG در مراحل ابتدایی تولید این پروتئین مطرح است. CsgF با قرار گرفتن در سطح خارجی باکتری، عامل اصلی اتصال و به دنبال آن روی هم قرار گرفتن پروتئین‌های CsgB و CsgA است و نقش مهمی در تجمع پروتئین کرلی بازی می‌کند (۱۸-۱۶) که در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار می‌گیرد.

ادهسین سطحی Ag43 که یک پروتئین خود القا شونده است در ۶۰ درصد از سویه‌های اشریشیا کلی یوروپاتوژن (Uropathogenic *E.coli*) یافت می‌شود. Ag43 توسط ژن flu کد شده و در محیط مایع سبب اتصال باکتری‌ها به یکدیگر می‌گردد و به دلیل همین ویژگی نقش افزایش این ادهسین در تشکیل بیوفیلم بر روی محیط‌های جامد مورد ارزیابی قرارگرفته است. سویه‌های موتانت این ادهسین قدرت کمی در تشکیل بیوفیلم از خود نشان می‌دهند. بنابراین Ag43 نه تنها در اتصال باکتری‌ها به سطح بلکه در اتصال به یکدیگر نقش ایفا می‌کند (۱۹و۲۰). همچنین در مطالعات IBC (Inter Bacterial Communication) تشکیل شده توسط باکتری اشرشیاکلی یوروپاتوژن در مثانه مدل‌های موشی دیده شده است. همانند پیلی نوع یک در اتصال به هر دو سطح زنده و غیرزنده نقش داشته و بیوفیلم به واسطه داشتن این آنتی‌ژن در مقابل اثرات عوامل اکسید کننده خارجی از خود محافظت می‌کند (۲۱).

در درمان موارد کله‌سیستیت حاد هنوز نقش آنتی‌بیوتیک‌ها به‌طور کامل مشخص نشده؛ اما ثابت شده است که آنتی‌بیوتیک در

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 13:54 +0430 on Sunday September 8th 2019

بیماران بدحال، افراد مسن، موارد نقص ایمنی مفید بوده و توصیه می شود (۲۲). در حال حاضر درمان تجربی بر پایه تجویز یک آنتی‌بیوتیک بتا لاکتام / به‌همراه مهار کننده بتا لاکتاماز نظیر آمپی‌سیلین - سولباکتام یا تازوباکتام در عفونت غیربیمارستانی است؛ اما در صورت نیاز، به جایگزینی از نسل سوم یا چهارم سفالوسپورین‌ها نیز استفاده می‌گردد (۵). این مقاومت‌ها در صورت وجود عوامل دیگر پاتوژنیسیته از جمله ایجاد بیوفیلم چندین بار می‌تواند افزایش یابد.

روش‌های ژنوتیپی و فنوتیپی مختلفی برای شناسایی باکتری‌ها ازجمله کشت بر روی محیط‌های اختصاصی و غیراختصاصی به‌کار می‌رود و همچنین روش‌های مولکولی بر روی ژن‌های مختلف باکتری‌ها انجام می‌گردد. 16SrRNA ریبوزومی از جمله ژن‌های مورد بررسی در باکتری‌ها است. در حال حاضر بیشترین هدف از بررسی این ژن، در مطالعات در اکولوژی باکتریایی است. استفاده از آن به‌دلیل تنوع باکتری‌ها با وجود تعداد متغیر کپی در ژنوم، نیز کاربرد دارد. این ژن دارای ۱۵۴۲ باز است که چندین ترادف آن در بین باکتری‌ها حفاظت شده است. مطالعات نشان داده است که با تکثیر قطعات مختلف این ژن و تعیین ترادف و مقایسه ترادف به‌دست آمده با کتابخانه موجود در NCBI می‌توان به گونه و جنس باکتری دست یافت. از پرایمرهای مختلف برای تکثیر 16SrRNA ریبوزومی استفاده می‌گردد. یکی از طویل‌ترین آنها، پرایمرهای F۲۷ و R۱۴۹۲ است که ۱۴۶۵ باز از ۱۵۴۲ باز از ژن این RNA را پوشش می‌دهد و برای استفاده در آزمایشات تشخیص باکتری در مطالعات مختلف مناسب است.

این مطالعه به منظور شناسایی باکتری‌های موجود در صفرای بیماران مبتلا به مشکلات صفراوی و بررسی تولید بیوفیلم در حضور ژن‌های CsgF (Ag43) flu در جدایه‌های شایع انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی روی ۳۵ نمونه (سنگ و بافت صفرا) جمع آوری شده در شرایط استریل (به روش لاپاراسکوپی) از بخش جراحی بیمارستان امام خمینی تهران طی ششماه اول سال ۱۳۹۵ انجام شد.

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق (IR.REC.1394.50) انستیتو پاستور ایران قرار گرفت. از بیماران رضایت‌نامه کتبی شرکت آگاهانه در مطالعه دریافت شد.

معیارهای ورود به مطالعه شامل بیماران دارای سنگ صفراوی و علایم درد شکمی ناشی از آن بود. همچنین بیمارانی که در آزمایشات، اختلالات کارکرد کبدی نداشتند و دارای AST، ALT، آلکالن فسفاتاز و بیلی روبین بالایی بودند. معیار عدم ورود به مطالعه شامل بیماران با مشکلات قلبی و عروقی بود که مانع از بیهوش شدن آنان می‌شد. برای هر بیمار پرسشنامه مربوط به اطلاعات نوع بیماری و آنتی‌بیوتیک مصرفی تکمیل شد. نمونه‌ها پس از نمونه‌برداری به‌طور کاملاً استریل در داخل فالکون ۵۰ حاوی محیط TSB قرار داده شد و روی یخ به انستیتو پاستورایران منتقل گردید.

تعیین هویت میکروبی: نمونه‌ها شامل سنگ و کیسه صفرا به‌طور کاملاً استریل دو قسمت شد. یک قسمت در داخل محیط Thio glycolate (از شرکت Difco quelab) گذاشته شد و داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شبانه روز تا ۴۸ ساعت انکوبه گردید و قسمت دیگر در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. یک قطعه از سنگ نصف و در محیط Thio glycolate قرار داده شد و یک قسمت دیگر برای آزمایشات بیوشیمیایی به آزمایشگاه مرکزی برای تشخیص جنس نمک فرستاده شد. بعد از ۲۴ ساعت تا دو روز که نمونه‌ها در داخل محیط Thio glycolate انکوبه شدند؛ بر روی محیط‌های Blood Agar و MacConkey Agar و LB Agar (از شرکت MERK آلمان) کشت داده شدند و در داخل جار میکرو آئروفیلیک به همراه شمع گذاشته شدند و به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. از باکتری‌هایی که رشد کردند؛ اسمیر تهیه شد و از یک کلنی تک رنگ آمیزی گرم و سپس به کمک تست‌های تشخیص افتراقی از لحاظ بیوشیمیایی، باکتری‌های مورد مطالعه تشخیص داده شدند. از نمونه‌های با کشت مثبت، از هر کلنی یک نمونه در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

حساسیت آنتی‌بیوتیکی: آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی نسبت به ۱۴ آنتی‌بیوتیک شامل سفکسیم، سفتریاکسون، سفازولین، سفتازیدیم، آمپی‌سیلین، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، آمیکاسین، ایمی‌پنم، ازترونام، تتراسایکلین، سفوتاکسیم، کلرامفنیکل، پیپراسیلین توام با تازوباکتام انجام شد. تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از راهنمای استاندارد آزمایشگاه‌های بالینی و با کمک روش انتشار دیسک محصول شرکت Rosco در محیط کشت مولر هینتون آگار انجام شد و هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری و با جدول استاندارد آنتی‌بیوتیک‌ها مقایسه گردید.

تخلیص DNA و تکثیر 16SrRNA ریبوزومی: به منظور شناسایی حضور باکتری‌های غیرقابل کشت، باکتری‌های بی‌هوازی و یا DNA باقیمانده باکتریایی تخلیص DNA از کیسه صفرا بر مبنای دستورالعمل کیت kia spin pcr template purification kit cat no:K1014-100 انجام شد. سپس ناحیه ژنی هدف 16SrRNA ریبوزومی به‌کمک روش PCR (Polymerase Chain Reaction) توسط پرایمرهای 1492R و 27F تکثیر شد (جدول یک) (۲۳).

۱۰۰ گرم از بافت کیسه صفرا تکه‌تکه و خورد شد و به اندازه یک‌سوم حجم آن بید شیشه‌ای ریخته شد. یک بار بدون آب مقطر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 13:54 +0430 on Sunday September 8th 2019

جدول ۱ : مشخصات پرایمرهای مورد استفاده PCR

نام ژن‌ها	طول محصول (bp)	ترادف و طول پرایمرها توالی بازها
16SrRNA	۱۳۰۰	27F: 5' AGAGCCCGATCMTGGCTCAG 1492 R:5' CAGGAAACAGCTATGAC
Ag43 (flu)	۳۰۰۰	Flu f: 5'-GGGTAAAGCTGATAATGTCG-3 Flu R: 5'-GTTGCTGAGTGAGTGTGC-3
Csg F	٤١٨	CsgF-6: 5'-GATTGTTAACCGACCATACC-3 CsgF-17: 5'-GCAGGTAAGTGCGTCAAATC-3

استریل و یک بار با یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل ورتکس شد. ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی پس از سانتریفوژ برداشته شد و به آن به اندازه یک میکرولیتر لیزوزیم (Cat No:MR7735) افزوده شد. پس از نیم ساعت ۱۰ میکرولیتر proteinase k اضافه شد و مجدداً سانتریفیوژ شد. مایع رویی روی ستون ریخته شد. شستشو توسط بافر IRB (دو مرتبه) و بافر WB (یک مرتبه) انجام شد. سپس توسط بافر EB، DNA از ستون خارج شد. پس از تعیین خلوص، از ۴ میکرولیتر از آن برای آزمایش تکثیر ژن 16SrRNA با استفاده از پرایمرهای 27F و 1492 R استفاده شد. واکنش PCR برای تکثیر توالی با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکر اپندرف آلمان انجام گردید. برنامه چرخه دمایی شامل شرایط دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل (در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه یک دقیقه) انجام شد. در پایان ۱۰ دقیقه طویل‌سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محصول‌های تکثیر یافته روی ژل آگارز یک درصد مورد مطالعه قرار گرفتند.

پس از جداسازی باند مربوط به تکثیر DNA از ژل توسط کیت Gel Extraction kitcat no:k0691 از شرکت فرمنتاز (k0691Fermentas) نمونه برای تعیین ترادف فرستاده شد. سپس توسط برنامه BLAST باکتری‌ها شناسایی شدند.

آماده‌سازی و انجام تست‌های سنگ کیسه صفرا: حضور کربنات و فسفات کلسیم، کلسترول و تری‌گلیسرید به‌کمک دستورالعمل موجود در کیت پارس آزمون توسط بخش بیوشیمی انستیتو پاستور به‌روش زیر انجام شد

سنگ‌ها در هاون پودر شدند و در هر فالکن ۳ میلی‌گرم پودر سنگ ریخته شد و به هر کدام ۳ میلی‌لیتر HCL(1N) اضافه شد. سپس توسط DDW به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. نمونه‌ها ورتکس شدند و داخل بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه گذاشته شدند. سپس نمونه‌ها برای تعیین غلظت در داخل دستگاه اتوآنالایزر (با مشخصات Technicon RA-1000) قرار داده شدند. باقی مواد متشکله سنگ شامل کربنات منیزیم و فسفات منزیم و بیلی‌روبین توسط آزمایشگاه پاتوبیولوژی مرکزی شناسایی شدند.

تست‌های تشخیص بیوفیلم: این تست بر روی باکتری‌های *E.coli* ایزوله شده از نمونه‌ها انجام شد. کلونی‌های تک را در محیط LB Broth به مدت ۱۶ ساعت کشت دادیم. ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱/۱۰۰ کشت شبانه به هر چاهک (نمونه‌های چهارتایی) اضافه شد. سپس محتویات چاهک‌ها دور ریخته شد. سپس۱۲۵ میکرولیتر کریستال ویوله یک درصد به هر چاهک اضافه شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پلیت داخل تشت آب غوطه‌ور شد و سپس آب اضافی از چاهک‌ها خارج گردید. سه الی چهار بار این کار تکرار شد. برای چند ساعت میکروپلیت را به‌صورت وارونه قرار دادیم تا خشک شود. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۸۰ درصد اتانول و ۲۰ درصد استون به هر چاهک به‌مدت ۱۵ دقیقه اضافه شد. پس از انتقال به چاهک جدید با طول موج ۵۶۰ nm با استفاده از دستگاه ELISAreader (Bio-TEK) خوانده شد (۲۴).

تخلیص ژنوم نمونه‌های *E.Coli* برای ارزیابی حضور ژن‌های بیوفیلم: پس از کشت شبانه باکتری تخلیص ژنوم باکتری انجام شد. به‌طور خلاصه به میزان ۲۵۰ میکرولیتر از محلول Resuspension به رسوب باکتری اضافه شد. بعد از ورتکس ۲۵۰ میکرولیتر از محلول Lysis اضافه شد و به‌شدت ورتکس شد. پس از اضافه نمودن ۳۵۰ میکرولیتر محلول Neutralization سانترفیوژ شد و مایع رویی از ستون تخلیص گذرانده شد. پس از دو بار شستشوی ستون با بافر شستشو ژنوم باکتری توسط بافر الوشن از ستون جدا شد.

برای تکثیر توالی ژن‌های ایجاد بیوفیلم با استفاده از پرایمر flu (Ag 43) (جدول یک) و DNA خالص شده در واکنش PCR قرار داده شد. برنامه آن شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، طویل‌سازی طی ۳۰ سیکل شامل (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله بعد یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. سپس طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و ۱۵ ثانیه انجام شد. سپس محصول‌های تکثیر یافته روی ژل آگارز یک درصد مورد مطالعه قرار گرفتند.

برای ژن CsgF از پرایمرهای آن استفاده شد (جدول یک). تحت شرایط دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 13:54 +0430 on Sunday September 8th 2019

جدول ۲ : نتایج پاتولوژی کیسه صفرا برحسب جنسیت و سن بیماران مبتلا به مشکلات صفراوی

نتایج پاتولوژی	جنسیت		میانگین سن (سال)	
	تعداد زنان	تعداد مردان	زنان	مردان
التهاب حاد با زمینه التهاب مزمن کیسه صفرا	۲	۲	۳۹	۵۰
التهاب حاد کیسه صفرا بازمینه التهاب مزمن و حضور سنگ	٦	۱	٤۷/۸	۵۰
التهاب مزمن کیسه صفرا	۵	۳	٤٦	٤۵
التهاب مزمن کیسه صفرا با سنگ	۱۲	٤	٤۱/۷	۵۲
جمع کل	۲۵	۱۰	٤۳/۸	٤۹/۳

جدول ۳ : بررسی عوامل پاتوژنیسیته اشریشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به سنگ صفرا

شماره نمونه	جنس	سن (سال)	تولید بیوفیلم	حضور ژن‌های تولید بیوفیلم CsgF & Ag43(Flu)	آنتی‌بیوتیک	مقاومت
۱	زن	۵۰	قوی	+	تتراسیکلین سفتیازیدیم سیپروفلوکساسین	مقاوم مرزی حساس
۲	مرد	۵۰	قوی	+	تتراسیکلین سفتیازیدیم سیپروفلوکساسین	مرزی مقاوم مقاوم
۳	زن	۵۰	متوسط	+	تتراسیکلین سفتیازیدیم سیپروفلوکساسین	مقاوم مرزی حساس
٤	زن	۵۲	متوسط	+	تتراسیکلین سفتیازیدیم سیپروفلوکساسین	مقاوم مرزی حساس

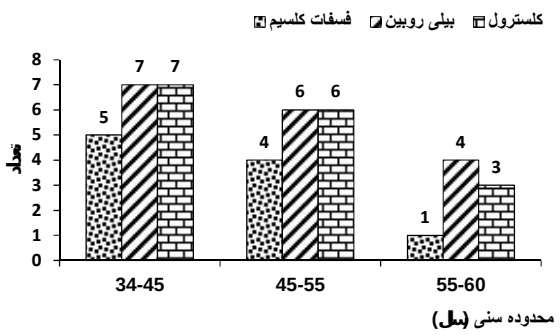
مدت یک دقیقه، طویل‌سازی طی ۳۰ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طویل‌سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه‌ای مورد تکثیر قرار داده شدند. سپس محصول‌های تکثیر یافته روی ژل آگارز یک درصد مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته‌ها

از۳۵ نمونه مورد مطالعه، ۲۵نمونه متعلق به زنان با میانگین سنی ۴۳/۸ سال و ۱۰ نمونه متعلق به مردان با میانگین سنی ۴۹/۳ سال بود (جدول ۲). سنگ صفرا در ۲۳ نمونه موجود بود و محدوده سنی ۱۰ بیمار ۴۵-۳۵ سال، ۷ بیمار ۵۵-۴۵ سال و ۶ بیمار ۶۰-۵۵ سال تعیین شد. ۹۸ درصد از سنگ‌ها دارای کلسترول و بیلی‌روبین بودند و تنها در گروه سنی ۶۰-۵۵ سال سنگ‌های حاوی بیلی‌روبین بیش از کلسترول مشاهده شد. سنگ‌ها دارای ترکیبات مختلف بودند و بیشترین تنوع و مورد سنگ متعلق به گروه سنی ۴۵-۳۵ بود. تعداد ۵ نمونه از سنگ‌ها به‌صورت کریستال‌هایی بودند که هنوز به سنگ تبدیل نشده بودند و در نتیجه مقادیر آن برای بررسی مواد تشکیل دهنده کافی نبود و در نمودار یک آورده نشدند (نمودار یک).

به‌طور عمده بیماران در دو گروه التهاب حاد با زمینه مزمن کیسه صفرا و التهاب مزمن کیسه صفرا با وجود سنگ و عدم آن مجبور به عمل جراحی شده بودند. بررسی پاتولوژی کیسه صفرا برای همه ۳۵ بیمار انجام شد. به طور کلی التهاب مزمن در صفرای همه بیماران مشاهده شد و ۲۳ بیمار (۶۵ درصد) مبتلا به سنگ صفرا نیز بودند. بیشتر نمونه‌های حاوی سنگ (۱۸ مورد) متعلق به زنان بود.

مراجعه به دلیل التهاب حادکیسه صفرا در ۱۲ بیمار (۳۴/۲درصد) مشاهده شد که پس از پاتولوژی وجود التهاب مزمن کیسه صفرا نیز ثبت شده بود. به‌طور کلی میانگین سنی در زنان دارای التهاب حاد ۴۷/۸ سال و در موارد فقط التهاب مزمن ۴۱/۷ سال تعیین شد. در مردان نیز به ترتیب ۵۰ و ۵۲ سال تعیین شد (جدول ۲).



نمودار ۱ : فراوانی مشخصات بیوشیمیایی سنگ‌های جدا شده از بیماران مبتلا به سنگ صفرا برحسب سن (سال)

در ۲۲ نمونه کیسه صفرا، رشد باکتری دیده نشد و ۱۳ نمونه همراه با حضور باکتری بود. از این میان نه نمونه (۶۹ درصد) باسیل گرم منفی و چهار نمونه (۳۰درصد) کوکسی گرم مثبت بودند.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 13:54 +0430 on Sunday September 8th 2019

به‌علاوه از ۱۱ نمونه فقط یک نوع باکتری جدا شد و در دو نمونه صفرای به‌دست آمده از بیمار دو نوع کلنی ریز و درشت هر دو از کلبسیلا بر روی محیط کشت مشاهده شد. به‌طور کلی کلبسیلا سه مورد، اشریشیا کلی چهار مورد، یک مورد انتروباکتر، دو مورد انتروکوک، دو مورد استافیلو کوک و یک مورد استرپتوکوک برروی محیط‌های کشت رشد کردند. از۲۳ نمونه سنگ، نه نمونه دارای باکتری بودند که شایع‌ترین آنان کلبسیلا (سه مورد) بود.

نمونه‌های صفرایی که هیچ باکتری در آنها رشد نکرد؛ مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند. به طوری که بر روی DNA جدا شده از ۲۲ بافت جستجو برای حضور ژن 16SrRNA به‌کمک تکنیک PCR انجام شد و هفت نمونه محصول تکثیرشده تعیین توالی شد. تعداد شش نمونه کلبسیلا شامل کلبسیلا Sp.L3 و پنج سویه کلبسیلا پنومونیه یک مورد strain NRC 37 و چهار مورد strain YkA2 بودند. همچنین یک مورد آنتروکوکوس هیره سویه strain SNNU0221 تعیین شد.

از میان باکتری‌ها به‌دلیل اهمیت اشریشیا کلی به‌عنوان باکتری فرصت‌طلب عوامل مختلف آن مورد بررسی قرار گرفت. این عوامل شامل توانایی و شدت ایجاد بیوفیلم، بررسی حضور ژن‌های ایجاد کننده بیوفیلم و مقاومت با آنتی‌بیوتیک‌ها بودند (جدول ۳).

چهار باکتری اشریشیا کلی دارای ژن‌های تولید بیوفیلم بودند؛ ولی توانایی و شدت تولید بیوفیلم در آنها متفاوت بود. آنها به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله سفکسیم، سفتریاکسون، سفازولین، آمپی‌سیلین، جنتامایسین، آمیکاسین، ایمی‌پنم، ازترونام، سفوتاکسیم، کلرامفنیکل، پیپراسیلین توام با تازوباکتام حساس بودند. الگوی مقاومت آنها برای سفتازیدیم، سیپروفلوکسازین، تتراسیکلین نیز متفاوت بود و اکثراً به تتراسیکلین مقاوم بودند و مقاومت به سفتازیدیم یا متوسط و یا شدید بود (جدول ۳).

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، ترکیبات کلسترولی و بیلی‌روبینی در ۹۸درصد نمونه‌های حاوی سنگ دیده شد و وفور کلبسیلا بیش از بقیه باکتری‌ها بود. بیشترین باکتری قابل کشت اشریشیا کلی تعیین شد. کلیه اشریشیا کلی‌های مورد بررسی دارای ژن‌های عامل ایجاد بیوفیلم بودند؛ ولی شدت تشکیل بیوفیلم در دو مورد از آنها قوی و در دو مورد دیگر متوسط بود. این باکتری‌ها نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بودند و به تتراسیکلین مقاوم‌تر بودند.

میزان بروز سنگ‌های صفراوی در زنان بیشتر از مردان است (۶) و نتایج مطالعه حاضر (۱۸ نمونه در زنان و ۵ نمونه در مردان) تاییدی بر این یافته بود. در مطالعه مسرت در سال ۲۰۰۱ شیوع شکل‌گیری سنگ‌های صفراوی در ایران براساس یافته‌های سونوگرافی به‌طور متوسط در زنان و مردان به‌ترتیب در حدود ۱۲ درصد و ۵ درصد گزارش شد (۲۲). همچنین در مطالعه Reshetnikov و همکاران در سال ۲۰۰۲ در سیبری روسیه نیز شیوع بالاتر سنگ صفراوی در زنان در بررسی سونوگرافی (۴/۹ برابر)نشان داده شد (۲۵) که کمی بیش از نسبت موارد گزارش شده توسط مطالعه حاضر (۳/۵۴ برابر) است و نزدیک به مطالعه Ersumo در سال ۲۰۰۴ در کشور اتیوپی است که فراوانی سنگ‌های صفراوی در زنان ۳/۰۳ برابر مردان گزارش شد (۲۶). در مطالعه Ersumo میانگین سنی مبتلایان ۴۲ سال بود و ۸۰ درصد مبتلایان در گروه سنی بالای ۵۰ قرار داشتند و با افزایش سن میزان بروز سنگ‌های صفراوی افزایش نشان داد (۲۶). نتایج مطالعه مسرت نشان داد که شیوع سنگ‌های صفراوی به‌طور فزاینده‌ای در مردان بالای ۶۰ سال و زنان بالای ۵۰ سال، بیش از ۶۰ برابر می‌شود (۲۲). در حالی که در مطالعه حاضر بیشترین تعداد سنگ در زنان پیش از ۵۰ سالگی و در مردان بالای ۵۰ سال تعیین شد که شاید نیازی برای مداقه بیشتر در روند و ارتباط کاهش سن به‌همراه ایجاد سنگ صفرا باشد.

در مطالعه حاضر ۹۸ درصد سنگ‌ها دارای کلسترول و بیلی‌روبین بودند و بیشترین مورد سنگ در گروه سنی ۴۵-۳۵ سال مشاهده شد که سنگ‌های کلسترولی و بیلی‌روبینی نسبت به سنگ‌های دیگر بیشتر بود. در مطالعه Stewart و همکاران در سال ۲۰۰۷، ۴۶درصد از سنگ‌ها از نوع کلسترولی و ۲۶درصد از نوع غیرکلسترولی بودند که همانند مطالعه حاضر میزان سنگ‌های کلسترولی درصد بالاتری را نسبت به سنگ های دیگر نشان داد (۲۷).

از عوامل به‌وجود آورنده سنگ‌های صفراوی می‌توان به باکتری‌ها اشاره کرد. در مطالعه حاضر از ۳۵ نمونه ۲۳ نمونه (۶۳ درصد) همراه با سنگ بود که در ۱۳ نمونه (۵۶ درصد) وجود باکتری با روش کشت (نه مورد) و PCR (چهار مورد) اثبات شد. از نمونه‌های بدون سنگ سه مورد کلبسیلا به‌روش PCR جدا شد که هر سه گونه پنومونیه بودند. در مطالعه مشابه انجام شده توسط Swidsinski و همکاران، ۵۸ درصد نمونه‌ها حاوی باکتری کشت مثبت بودند (۲۸) که با نتایج مطالعه حاضر (۵۶ درصد) نزدیک است.

در حالی که نیاز به تجویز آنتی‌بیوتیک در بیماران بدحال، سالمند، موارد نقص ایمنی و ایکتر فید مهم است؛ نقش آنتی‌بیوتیک‌ها در منفی شدن موارد کشت عوامل عفونی کله‌سیستیت حاد هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است. به‌نظر می‌رسد که در مطالعه حاضر مصرف آنتی‌بیوتیک قبل از عمل نیز باعث منفی شدن نتایج کشت نمونه‌های بعضی از بیماران شده است.

در مطالعه Shen و همکاران شیوع باکتری‌ها ترتیب نزولی شامل گونه‌های اشریشیا کلی، سودوموناس، سیتروباکتر و کلبسیلا داشت

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 13:54 +0430 on Sunday September 8th 2019

(۲۹). در مطالعه حاضر ترتیب نزولی شامل گونه‌های کلبسیلا، اشریشیاکلی، استافیلوکوک، انتروکوک، آنتروباکتر و استرپتوکوک بودند. در مطالعه تاج‌الدین و همکاران باکتری‌های اشرشیاکلی (۳۴/۴ درصد)، انتروکوکوس (۱۹/۷ درصد)، کلبسیلا پنومونیه (۱۸ درصد) و سودوموناس ائروژینوزا (۱۸درصد) تعیین شدند (۳۰). در هر سه مطالعه فوق گرم منفی‌ها به‌خصوص اشریشیا کلی (در بین باکتری‌های قابل کشت) شایع‌ترین باکتری موجود بود.

با توجه به جستجوی ما، مطالعه‌ای در زمینه ایجاد بیوفیلم توسط اشریشیا کلی در کیسه صفرای مبتلایان به بیماری‌های صفراوی انجام نشده بود. در این مطالعه چهار مورد اشریشیاکلی جدا شده از صفرا دارای ژن‌های تولید بیوفیلم بودند؛ ولی توانایی و شدت تولید بیوفیلم درآنها متفاوت بود. در مطالعه حاضر ۱۰۰درصد اشریشیاکلی‌ها قادر به ایجاد بیوفیلم بودند. در حالی که در مطالعه تاجبخش و همکاران بر روی عفونت‌های ادراری، از ۱۳۰ ایزوله اشریشیا کلی ۶۱/۳ درصد توانایی ایجاد بیوفیلم را داشتند (۳۱) که می‌تواند به‌علت تفاوت در نوع بیماری و یا تعداد ایزوله‌های مورد آزمایش باشد.

ژن‌های تولید بیوفیلم در اکثر باکتری‌ها موجود است؛ ولی تولید فنوتیپی بیوفیلم درجات مختلفی دارد و با پاتوژنیسیته باکتری رابطه مستقیم دارد (۲۱). تولید بیوفیلم در بیماران مبتلا به بیماری‌های صفراوی در این مطالعه نشان داد که در همه اشریشیا کلی‌ها ژن‌های ویرولانس کرلی CsgF و Ag 43 وجود داشته است و کمیت انواع و کیفیت بیوفیلم تنها به حضور این دو ژن مرتبط نیست. این امر در مطالعه تقدسی و همکاران نشان داده شد. به‌طوری که در بین ۷۴ اشریشیا کلی غیر O157 رابطه‌ای بین شدت تولید بیوفیلم و حضور ژن Ag43 وجود نداشت (۳۲).

تولید انواع بیوفیلم نیز توسط تاجبخش و همکاران بر روی ۱۳۰ ایزوله اشریشیا کلی مورد بررسی قرار گرفت. در کل بیوفیلم‌ها انواع قوی ۱۸/۷۵درصد، متوسط ۲۵ درصد و ضعیف ۵۶/۲۵درصد گزارش شدند (۳۱). در مطالعه حاضر نیز شدت تولید قوی در ۵۰ درصد و متوسط نیز در ۵۰ درصد موارد بود و این اختلاف درصد، در دو مطالعه می‌تواند به‌علت تفاوت در نوع بیماری و یا تعداد ایزوله‌های مورد آزمایش باشد. در مطالعه حاضر حساسیت اشریشیا کلی‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها به‌غیر از سیپروفلوکسازین و تتراسیکلین دیده شد که در مقایسه با مقاومت در مطالعه تاجبخش و همکاران (۳۱) متفاوت بود.

شاید بررسی دقیق‌تر باکتری‌های عامل ایجاد سنگ‌های صفراوی و نیز نوع سنگ، کمک موثری به پیشگیری از ایجاد عفونت مزمن نموده تا متعاقباً بیماری‌های گسترده‌تری ایجاد نشود. همچنین نتایج بررسی ایجاد بیوفیلم می‌تواند در درمان‌های آنتی‌بیوتیکی انواع مزمن بیماری و پیشگیری از آن کاربرد داشته باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری های غیرقابل کشت، سهم مهمی در عفونت های کیسه صفرا دارند. توانایی بالای ایجاد بیوفیلم در باکتری‌های شایع جداشده هشداری مبنی بر تجویز دقیق آنتی‌بیوتیک‌ها برای تقابل با بیوفیلم‌های عفونی در عفونت‌های کیسه صفرا است.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح مصوب (شماره ۸۶۲) بخش بیولوژی مولکولی انستیتو پاستور ایران بود و با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران به انجام رسید. بدین‌وسیله از کارکنان بخش جراحی بیمارستان امام خمینی تهران تشکر می‌گردد.

References

1. Sifri CD, Madoff LC. Infections of the liver and biliary system. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2010; pp: 1035-45.

2. Melzer M, Toner R, Lacey S, Bettany E, Rait G. Biliary tract infection and bacteraemia: presentation, structural abnormalities, causative organisms and clinical outcomes. Postgrad Med J. 2007 Dec; 83(986): 773-76. doi: 10.1136/pgmj.2007.064683

3. Namias N, Demoya M, Sleeman D, Reever CM, Raskin JB, Ginzburg E, et al. Risk of postoperative infection in patients with bactibilia undergoing surgery for obstructive jaundice. Surg Infect (Larchmt). 2005; 6(3): 323-28. doi: 10.1089/sur.2005.6.323

4. Biscione FM, Couto RC, Pedrosa TM, Neto MC. Comparison of the risk of surgical site infection after laparoscopic cholecystectomy and open cholecystectomy. Infect Control Hosp Epidemiol. 2007 Sep; 28(9): 1103-6. doi: 10.1086/519931

5. Vollmer CM Jr, Callery MP. Biliary injury following laparoscopic cholecystectomy: why still a problem? Gastroenterology. 2007 Sep; 133(3): 1039-41. doi: 10.1053/j.gastro.2007.07.041

6. Vafaeimanesh J, Alebouyeh M, Seyyedmajidi M, Tajeddin E, Sherafat SJ, et al. Molecular Detection of Helicobacter Species and Other Bacteria in Human Bile Samples of Patients with Biliary Diseases. J Gastrointest Dig Syst. 2012; 2: 106. doi:10.4172/2161-069X.1000106

7. Vaishnavi C, Singh S, Kochhar R, Bhasin D, Singh G, Singh K. Prevalence of Salmonella enterica serovar typhi in bile and stool of patients with biliary diseases and those requiring biliary drainage for other purposes. Jpn J Infect Dis. 2005 Dec; 58(6): 363-65.

8. Manolis EN, Filippou DK, Papadopoulos VP, Kaklamanos I, Katostaras T, Christianakis E, et al. The culture site of the gallbladder affects recovery of bacteria in symptomatic cholelithiasis. J Gastrointestin Liver Dis. 2008 Jun; 17(2): 179-82.

9. Austin JW, Sanders G, Kay WW, Collinson SK. Thin aggregative fimbriae enhance Salmonella enteritidis biofilm formation. FEMS Microbiol Lett. 1998 May; 162(2): 295-301. doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13012.x

10. Kikuchi T, Mizunoe Y, Takade A, Naito S, Yoshida S. Curli fibers are required for development of biofilm architecture in Escherichia coli K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. Microbiol Immunol. 2005; 49(9): 875-84.

11. Van Houdt R, Michiels CW. Role of bacterial cell surface

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 13:54 +0430 on Sunday September 8th 2019

structures in Escherichia coli biofilm formation. Res Microbiol. 2005 Jun-Jul; 156(5-6): 626-33. doi: 10.1016/j.resmic.2005.02.005

12. Vidal O, Longin R, Prigent-Combaret C, Dorel C, Hooreman M, Lejeune P. Isolation of an Escherichia coli K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. J Bacteriol. 1998 May; 180(9): 2442-49.

13. Hammar M, Arnqvist A, Bian Z, Olsén A, Normark S. Expression of two csg operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in Escherichia coli K-12. Mol Microbiol. 1995 Nov; 18(4): 661-70.

14. Robinson LS, Ashman EM, Hultgren SJ, Chapman MR. Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein. Mol Microbiol. 2006 Feb; 59(3): 870-81. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04997.x

15. Barnhart MM, Chapman MR. Curli biogenesis and function. Annu Rev Microbiol. 2006; 60: 131-47. doi: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142106

16. Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Hammar M, et al. Role of Escherichia coli curli operons in directing amyloid fiber formation. Science. 2002 Feb; 295(5556): 851-55. doi: 10.1126/science.1067484

17. Hammar M, Bian Z, Normark S. Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jun; 93(13): 6562-66. doi: 10.1073/pnas.93.13.6562

18. Loferer H, Hammar M, Normark S. Availability of the fibre subunit CsgA and the nucleator protein CsgB during assembly of fibronectin-binding curli is limited by the intracellular concentration of the novel lipoprotein CsgG. Mol Microbiol. 1997 Oct; 26(1): 11-23.

19. Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, et al. Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies. J Appl Microbiol. 2016 Aug; 121(2): 309-19. doi: 10.1111/jam.13078

20. Reisner A, Haagensen JA, Schembri MA, Zechner EL, Molin S. Development and maturation of Escherichia coli K-12 biofilms. Mol Microbiol. 2003 May; 48(4): 933-46.

21. van der Woude MW, Henderson IR. Regulation and function of Ag43 (flu). Annu Rev Microbiol. 2008; 62: 153-69. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162938

22. Massarrat S. Prevalence of gallstone disease in Iran. J Gastroenterol Hepatol. 2001 May; 16(5): 564-67.

23. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol. 1991 Jan; 173(2): 697-703. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991

24. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. J Vis Exp. 2011 Jan; (47) pii: 2437. doi: 10.3791/2437

25. Reshetnikov OV, Ryabikov AN, Shakhmatov SG, Malyutina SK. Gallstone disease prevalence in Western Siberia: cross-sectional ultrasound study versus autopsy. J Gastroenterol Hepatol. 2002 Jun; 17(6): 702-707.

26. Ersumo T. Gallstone disease in a teaching hospital, Addis Ababa: a 5-year review. Ethiop Med J. 2006 Jan; 44(1): 49-59.

27. Stewart L, Griffiss JM, Jarvis GA, Way LW. Gallstones containing bacteria are biofilms: bacterial slime production and ability to form pigment solids determines infection severity and bacteremia. J Gastrointest Surg. 2007 Aug; 11(8): 977-83. doi: 10.1007/s11605-007-0168-1

28. Swidsinski A, Schlien P, Pernthaler A, Gottschalk U, Bärlehner E, Decker G, et al. Bacterial biofilm within diseased pancreatic and biliary tracts. Gut. 2005 Mar; 54(3): 388-95. doi: 10.1136/gut.2004.043059

29. Shen H, Ye F, Xie L, Yang J, Li Zh, Xu P, et al. Metagenomic sequencing of bile from gallstone patients to identify different microbial community patterns and novel biliary bacteria. Sci Rep. 2015; 5: 17450. doi: 10.1038/srep17450

30. Tajeddin E, Jahani Sherafat S, Seyyed Majidi MR, Alebouyeh M, Nazemalhosseini Mojarad E, Pourhossengholi A, et al. [The Frequency of Bacterial Agents in the Bile Juice of Patients with Bile Stones and Biliary Disorders]. Med Lab J. 2011; 5(2): 34-43. [Article in Persian]

31. 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. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2016; 5: 11. https://doi.org/10.1186/s13756-016-0109-4

32. 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 Microbil. 2017; 9(2): 98-96.

www.SID.ir