ارتباط تولید بیوفیلم و مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های اشرشیا کلای جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در اصفهان در سال ۱۳۹۶

علی قاسمی[۱و۲]، فاتح رحیمی[۳*]، محمد کتولی[۴]

۱- دکتری تخصصی میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۲- دکتری تخصصی میکروبیولوژی، استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان
۳- دکتری تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان
۴- دکتری تخصصی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشکده بهداشت و علوم ورزشی، دانشگاه سان شاین کوست استرالیا
*نشانی برای مکاتبه: f.rahimi@sci.ui.ac.ir

چکیده

سابقه و هدف: *عفونت دستگاه ادراری یکی از شایعترین عفونتها و از مهمترین دلایل مرگ و میر در انسان به شمار می رود. اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک عامل اصلی عفونت ادراری در انسان است که به علت توانایی این باکتری برای تشکیل بیوفیلم منجر به مقاومت سطح بالا نسبت به کلاسهای مختلف آنتی بیوتیکی می شود. تشکیل بیوفیلم شاخص اصلی ایجاد عفونتهای پایدار و عود عفونتهای ادراری محسوب می شود. این مطالعه با هدف تعیین شیوع سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم و بررسی ارتباط مقاومت آنتی بیوتیکی با کمّیت و کیفیت بیوفیلم تشکیل شده در بیماران مبتلا به عفونت ادراری در اصفهان انجام گرفته است.*

روش کار: *جهت انجام این مطالعه در طی سال ۱۳۹۶، در مجموع ۲۱۳ ایزوله شکوک به اشرشیا کلای از افراد مبتلا به عفونت ادراری در یک بیمارستان مرجع در اصفهان جمع آوری و با استفاده از آزمونهای تشخیصی بیوشیمیایی و تأییدی PCR مورد شناسایی قرار گرفتند. تولید کورلای[۱]/سلولز و تشکیل بیوفیلم به ترتیب با استفاده از آزمونهای کیفی قرمز کنگو و کمّی میکروتیتر پلیت مورد بررسی قرار گرفت. حساسیت سویه های مولد بیوفیلم نسبت به ۱۷ آنتی بیوتیک به روش انتشار دیسک و بر اساس دستورالعملهای Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) تعیین گردید.*

یافته ها: *با استفاده از آزمونهای معمول بیوشیمیایی و PCR در مجموع ۱۶۶ سویه (۷۸ درصد) به عنوان اشرشیا کلای مورد شناسایی و تأیید قرار گرفتند. براساس نتایج آزمونهای کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمّی میکروتیتر پلیت، در مجموع ۳۹ سویه (۲۳ درصد) قادر به تشکیل بیوفیلم با واسطه تولید کورلای و/یا سلولز بودند. بالاترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های اشرشیا کلای بیوفیلم مثبت نسبت به آمپی سیلین و به دنبال آن سفوتاکسیم، سفپودوکسیم و سفتریاکسون مشاهده شد. از طرف دیگر، کارباپنمها و آمینوگلیکوزیدها نیز مؤثرترین آنتی بیوتیکها بر علیه عفونتهای ناشی از اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم بودند.*

نتیجه گیری: *نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده شیوع بالای سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم مقاوم به آنتی بیوتیک در میان بیماران مبتلا به عفونت ادراری در اصفهان است. علاوه بر این، ارتباط مستقیمی میان توانایی تولید بیوفیلم قوی و مقاومت آنتی بیوتیکی سطح بالا در سویه های اشرشیا کلای بیوفیلم مثبت مشاهده گردید.*

کلمات کلیدی: عفونت مجاری ادراری، اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک، بیوفیلم، کارباپنمها، آمینوگلیکوزیدها

مقدمه

عفونت ادراری با تقریباً ۱۵۰ میلیون مورد ابتلای سالیانه در سراسر جهان، یکی از شایعترین بیماریهای عفونی در انسان به شمار می رود که در موارد شدید منجر به ایجاد باکتریمی و حتی مرگ می شود (۱). این عفونت در نتیجه تهاجم میکروارگانیسمها به مجاری ادراری و متعاقباً تکثیر و انتشار در دستگاه ادراری ایجاد می شود (۲). اگرچه انواع مختلفی از

[۱] Curli

میکروارگانیسمها مانند باکتریها، ویروسها و قارچها توانایی ایجاد عفونت ادراری را دارند، اما باکتری *اشرشیا کلای*، که یک باکتری همزیست در دستگاه گوارش انسان و حیوانات است، از مهمترین عوامل ایجاد این عفونت محسوب می شود و در تقریباً ۷۰ تا ۸۵ درصد عفونتهای ادراری انسان مشاهده می شود (۲، ۳). عفونتهایی مانند پریتونیت، گندخونی و باکتریمی در کنار عفونت دستگاه ادراری، از جمله عفونتهای خارج روده ای ایجاد شده توسط سویه های بیماریزای *اشرشیا کلای* می باشند (۴). عفونتهای ادراری از عوامل مهم مرگ و میر در نوزادان پسر، مردان در سنین بالا و زنان در تمامی سنین محسوب می شوند. عود مکرر، پیلونفریت، سپسیس، آسیب کلیوی در کودکان و زایمان زودرس از عوارض جانبی و بسیار خطرناک عفونتهای ادراری به شمار می روند (۵). علاوه بر این، استفاده مکرر از مواد ضدمیکروبی منجر به گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی می شود؛ به طوریکه در سالهای اخیر، ظهور سویه های *اشرشیا کلای* با مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه، مدیریت این عفونتها را بسیار پرهزینه و پرچالش کرده است (۶).

عوامل بیماریزایی متعددی در کلونیزه شدن سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک در مجرای ادراری و ایجاد عفونت ادراری نقش دارند. از مهمترین عوامل بیماریزایی *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، عوامل سطحی مرتبط با اتصال مانند؛ فلاژل، پروتئینهای غشای خارجی، لیپوپلی ساکارید، ادهسینهای فیمبریه ای به ویژه فیمبریه مجعد (کورلای)، ادهسینهای غیرفیمبریه ای و کپسول پلی ساکاریدی می باشند (۷، ۸). باکتریهای تشکیل دهنده بیوفیلم در بیش از ۸۰ درصد از کل عفونتهای باکتریایی شرکت دارند. تشکیل بیوفیلم در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک، یکی از مهمترین عوامل بیماریزایی محسوب می شود که نقش بسیار مهمی در عفونتهای ادراری به ویژه عفونتهای پایدار و پروستاتیت حاد بازی می کند (۹). تشکیل بیوفیلم باکتریایی شامل اتصال اولیه، تشکیل میکروکلنی، تولید ماده پلیمری خارج سلولی و به دنبال آن رشد، بلوغ و در نهایت رهایی سلولها از بیوفیلم می باشد (۱۰). حضور ساختارهای اختصاصی با نقش اتصالی و توانایی تشکیل بیوفیلم در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک، باعث افزایش مقاومت به عوامل ضدمیکروبی مختلف و همچنین افزایش احتمال زنده ماندن و بقاء در جوامع و محیطهای گوناگون می شود (۱۱). علاوه بر آن، سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، نوع خاصی از بیوفیلم را که به صورت اجتماعات باکتریایی درون سلولی می باشد در داخل سلولهای پوششی مثانه تولید می کنند که باعث مقاومت باکتری در برابر قدرت پاک کننده جریان ادرار، عوامل ضدمیکروبی و سازوکارهای دفاعی میزبان خواهد شد (۱۲). وجود این ویژگی در سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم، باعث ماندگاری باکتری در بدن برای ماهها و یا حتی سالها شده که این خود منجر به عود عفونت و ایجاد عفونتهای مزمن می گردد (۱۲).

استفاده وسیع، بدون برنامه و نادرست از آنتی بیوتیکها در کنار عوامل ژنتیکی مانند انتقال افقی ژنها و انتشار کلونال سویه های مقاوم به مواد ضدمیکروبی مختلف، نقش حیاتی در گسترش و اکتساب مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتریها ایفا می کند. آنتی بیوتیکها، داروهای انتخابی در درمان عفونتهای ادراری می باشند، اما امروزه به علت افزایش سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مقاوم، به ویژه سویه های با فنوتایپ مقاوم به چند دارو، نه تنها عفونتهای ادراری ناشی از این باکتری درمان نمی شوند، بلکه این عفونتها از مخازن و منابع مهم گسترش باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک در بیمارستانها به شمار می روند (۱۳, ۱۴). مطالعات متعددی نشان داده اند که سازوکارهای معمول مقاومت آنتی بیوتیکی سهم بسیار کمی در زنده ماندن باکتریهای موجود در یک بیوفیلم دارند، به طوریکه باکتریهای موجود در یک بیوفیلم بر خلاف حالت منفرد، حتی ممکن است در برابر غلظتهای بالای آنتی بیوتیکهای باکتری کش نیز مقاوم باشند (۱۵-۱۷). از بارزترین خصوصیات عوامل بیماریزای مولد بیوفیلم از جمله *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، ایجاد عفونتهای عودشونده است؛ و مهمترین خصوصیت این عوامل عفونی، مقاومت شدید آنها در برابر غلظتهای بالای آنتی بیوتیکها است (۶, ۱۸). به علت تأخیر در تشخیص آزمایشگاهی عفونت ادراری حاصل از *اشرشیا کلای*، غالباً درمان اولیه بیماری به صورت تجربی صورت می گیرد. بنابراین آگاهی از پروفایل مقاومتی ایزوله های بیمارستانی و غیربیمارستانی *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک به منظور انتخاب راهکار درمانی مناسب از اهمیت بالایی برخوردار می باشد.

بیوفیلم تشکیل شده توسط سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک، عامل اصلی مقاومت باکتری در برابر مواد ضدمیکروبی مختلف می باشد که منجر به شیوع بالا و بازگشت مکرر عفونت ادراری می شود (۹، ۱۱، ۱۲). از طرف دیگر، عوارض شدید عفونت ادراری بر سلامتی افراد بیمار، باعث صرف هزینه های درمانی بالایی می شود که این عفونت را به یک معضل بهداشتی نگران کننده در سراسر جهان تبدیل کرده است. بنابراین شناسایی بیوفیلم در ایزوله های *اشرشیا کلای*

اوروپاتوژنتیک و استفاده از روشهای مناسب و سریع برای غربالگری سویه های مولد بیوفیلم و همچنین بررسی ارتباط کمّیت و کیفیت بیوفیلم تشکیل شده با میزان مقاومت آنتی بیوتیکی، ضروری است و می تواند به انتخاب راهکار درمانی مناسب و پیشگیری از عود عفونت کمک کند؛ و همچنین از ایجاد مشکلات اداری شدید مانند پیلونفریت و پروستاتیت جلوگیری نماید. این مطالعه با هدف بررسی ارتباط میان تولید بیوفیلم و مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در یک بیمارستان مرجع در شهر اصفهان طی سال ۱۳۹۶ به انجام رسیده است.

مواد و روشها

جمع آوری و شناسایی ایزوله های *اشرشیا کلای*

در بازه زمانی شهریور لغایت بهمن ۱۳۹۶، در مجموع تعداد ۲۱۳ ایزوله *اشرشیا کلای* جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونتهای ادراری در یک بیمارستان مرجع در شهر اصفهان جمع آوری گردید. جهت شناسایی اولیه ایزوله های *اشرشیا کلای*، هر ایزوله بر روی محیط ژلوز مک‌کانکی (Merck, Germany) به صورت خطی کشت داده شد و پس از انکوباسیون، ایزوله های با رنگ کلنی صورتی به عنوان سویه های مشکوک به *اشرشیا کلای* انتخاب شدند (۱۹). شناسایی و تأیید اولیه ایزوله ها با کشت بر روی ژلوز ائوزین متیلن بلو (Merck, Germany) انجام شد و ایزوله های با کلنی ارغوانی تیره و یا جلای سبز فلزی به عنوان سویه های *اشرشیا کلای* نگهداری شدند (۱۹). جهت تأیید نهایی ایزوله های *اشرشیا کلای*، آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *tuf*A (رمزکننده پروتئین عامل طویل کننده EF-TU) معرفی شده توسط Vareille و همکاران مورد استفاده قرار گرفت (۲۰).

بررسی تولید بیوفیلم

بررسی کیفی تشکیل بیوفیلم (تولید کورلای و سلولز) در میان سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک با استفاده از آزمون ژلوز قرمز کنگو و بر اساس دستورالعمل Romling و همکاران انجام شد (۲۱) و سویه های *اشرشیا کلای* براساس توانایی تولید کورلای و سلولز به ۴ مورفوتایپ radr (کلنی قرمز، خشک و خشن؛ مولد سلولز و کورلای)، bdar (قهوه ای، خشک و خشن؛ فقط مولد کورلای)، pdar (صورتی، خشک و خشن؛ فقط مولد سلولز) و saw (کلنی صاف و سفید؛ عدم تولید سلولز و کورلای) طبقه بندی شدند. سویه های *اشرشیا کلای* با مورفوتایپ rdar، bdar و pdar، به عنوان سویه های مولد بیوفیلم و سویه های با مورفوتایپ saw، به عنوان سویه های بیوفیلم منفی در نظر گرفته شدند. همچنین بررسی کمّی تولید بیوفیلم در سویه های *اشرشیا کلای*، با روش میکروتیتر پلیت و براساس دستورالعمل O'Toole و همکاران انجام گرفت (۲۲) و با توجه به میانگین جذب نوری چاهکهای مربوط به هر سویه در طول موج ۵۷۰ نانومتر در دستگاه خوانشگر الایزا (Stat Fax 2100)، سویه های *اشرشیا کلای* به ۴ گروه بیوفیلم قوی، متوسط، ضعیف و بیوفیلم منفی طبقه بندی شدند.

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی

حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت در برابر ۱۷ آنتی بیوتیک رایج مورد استفاده در درمان عفونتهای ادراری، با روش استاندارد انتشار دیسک بر روی محیط ژلوز مولر هینتون (Merck- Germany) و بر اساس دستورالعمل Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۳). آنتی بیوتیکهای مورد استفاده در این مطالعه شامل آمپی سیلین (AM, 10 µg)، آموکسی سیلین/کلاوولانیک اسید (AMC, 30/10 µg)، پیپراسیلین/تازوباکتام (TPZ, 100/10 µg)، سفوتاکسیم (CTX, 30 µg)، سفتازیدیم (CAZ, 30 µg)، سفتریاکسون (CRO, 30 µg)، سفوکسی تین (FOX, 30 µg)، سفپودوکسیم (CPD, 10 µg)، ایمی پنم (IMP, 10 µg)، مروپنم (MEM, 10 µg)، جنتامایسین (GN, 10 µg)، آمیکاسین (AK, 30 µg)، کانامایسین (KA, 30 µg)، سیپروفلوکساسین (CIP, 5 µg)، افلوکساسین (OFX, 5 µg)، لووفلوکساسین (LEV, 5 µg) و سولفامتوکسازول/تری متوپریم (STX, 30/10 µg) تهیه شده از شرکت Cypress Diagnostics (بلژیک) بودند. برای این منظور، ابتدا با انتقال کلنی از کشت ۲۴ ساعته هر یک از سویه های *اشرشیا کلای* به داخل سرم فیزیولوژی، سوسپانسیونی با کدورت معادل نیم مک فارلند تهیه گردید و سپس با استفاده از سواپ استریل، از کدورت نیم مک فارلند هر سویه به صورت انبوه بر روی محیط ژلوز مولر هینتون کشت داده شد. سپس، بعد از انتقال دیسکهای آنتی بیوتیکی و گرمخانه گذاری پلیتها، با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد، فعالیت ضدمیکروبی هر آنتی بیوتیک بر اساس معیارهای

تفسیری ارائه شده توسط CLSI ارزیابی گردید. همچنین، از سویه *اشرشیا کلای* ATCC 25922 به عنوان کنترل در آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی استفاده شد. علاوه بر این، بر اساس توصیه Magiorakos و همکاران (۲۴)، سویه های *اشرشیا کلای* مقاوم به حداقل سه کلاس آنتی بیوتیکی مختلف، سویه های با مقاومت دارویی چندگانه (MDR) در نظر گرفته شدند.

تجزیه و تحلیل داده های آماری

به منظور انجام بررسیهای آماری و تجزیه و تحلیل داده های به دست آمده در طی آزمونهای مختلف و همچنین جهت رسم تمامی نمودارها از نرم افزار GraphPad Prism 5 استفاده گردید.

نتایج

ایزوله ها و خصوصیات بالینی

براساس نتایج حاصل از آزمونهای فنوتایپی شناسایی ایزوله ها با استفاده از محیطهای کشت انتخابی ژلوز مک کانکی و ژلوز ائوزین متیلن بلو، از مجموع ۲۱۳ ایزوله *اشرشیا کلای* جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری که در آزمایشگاه بیمارستان مورد شناسایی قرار گرفته بودند، تنها ۱۶۶ ایزوله (۷۸ درصد) به عنوان سویه های مشکوک به *اشرشیا کلای* انتخاب شدند. نتایج حاصل از تأیید نهایی ایزوله ها به وسیله آزمون PCR و پرایمرهای اختصاصی نشان داد که تمامی ۱۶۶ ایزوله واجد باند ۲۰۰ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن *tuf*A بودند و بنابراین به عنوان سویه های *اشرشیا کلای* مورد تأیید قرار گرفتند.

بررسی تولید بیوفیلم

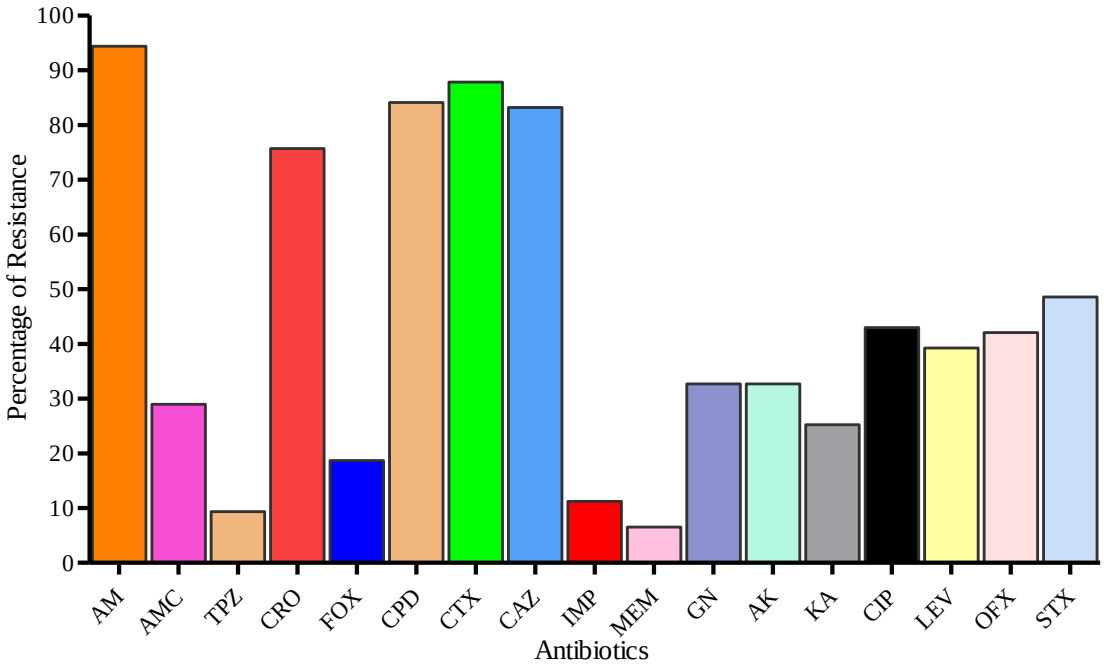
براساس توانایی تولید کورلای و سلولز و تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک به روش کیفی بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو، از مجموع ۱۶۶ سویه تأیید شده، ۳۹ سویه (۲۳ درصد) قادر به تولید کورلای و سلولز بودند و به عنوان سویه های بیوفیلم مثبت انتخاب شدند که در میان این سویه ها، ۱۵ سویه (۳۸ درصد) با تولید همزمان کورلای و سلولز واجد مورفوتایپ rdar، ۲۳ سویه (۵۹ درصد) با تولید فقط کورلای واجد مورفوتایپ bdar و ۱ سویه (۳ درصد) نیز با تولید فقط سلولز واجد مورفوتایپ pdar بودند. همچنین براساس توانایی کمّی تشکیل بیوفیلم در میان سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک تأیید شده، تمامی ۳۹ سویه واجد توانایی تولید کورلای و/یا سلولز در آزمون قرمز کنگو، قادر به تولید بیوفیلم بودند که در میان آنها ۷ سویه (۱۸ درصد) مولد بیوفیلم قوی، ۱۰ سویه (۲۶ درصد) مولد بیوفیلم متوسط و ۲۲ سویه (۵۶ درصد) مولد بیوفیلم ضعیف بودند (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه فراوانی مورفوتایپهای rdar، bdar و pdar با گروههای بیوفیلمی مختلف در *سویه های اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک.

گروه بیوفیلمی	مورفوتایپ (درصد)			
	rdar	bdar	pdar	تعداد کل
بیوفیلم قوی	۷ (۱۰۰)	۰	۰	۷
بیوفیلم متوسط	۶ (۶۰)	۴ (۴۰)	۰	۱۰
بیوفیلم ضعیف	۲ (۹)	۱۹ (۸۶)	۱ (۵)	۲۲
تعداد (درصد)	۱۵ (۳۸)	۲۳ (۵۹)	۱ (۳)	۳۹

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی

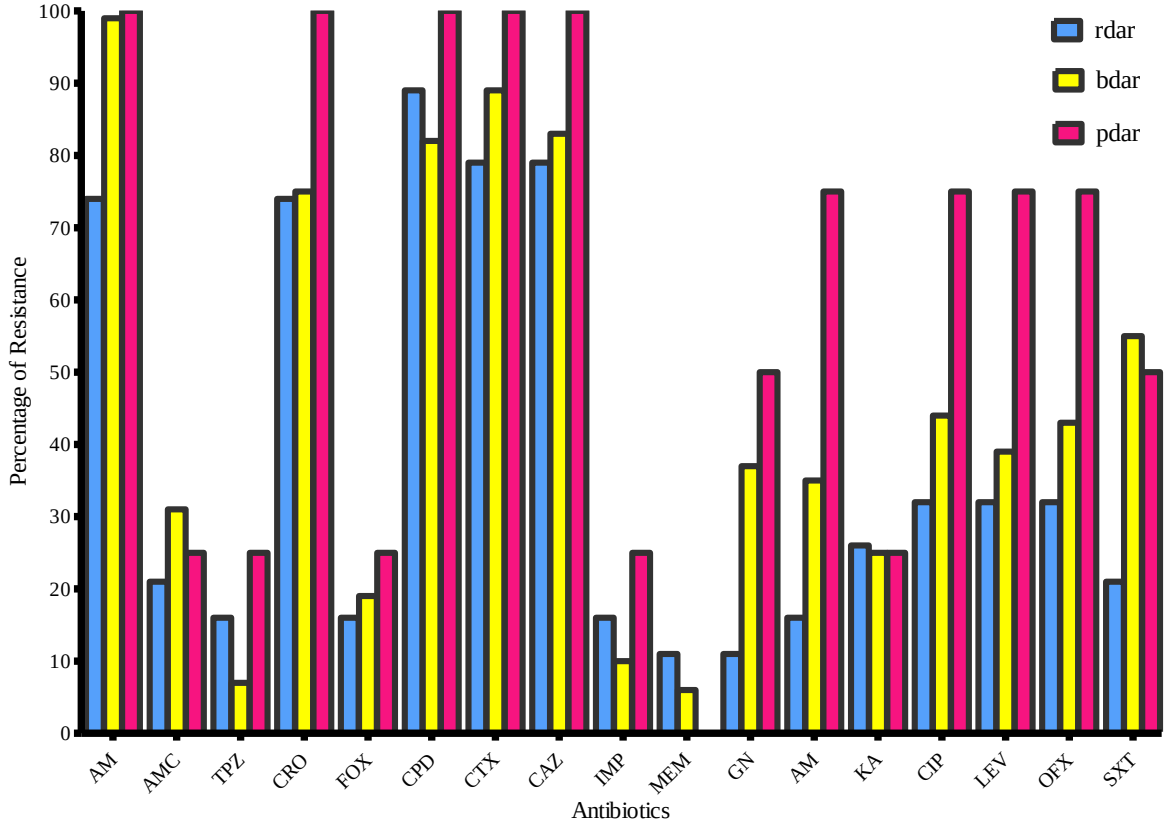
آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت در برابر ۱۷ آنتی‌بیوتیک مورد بررسی، نشان دهنده تنوع بالایی در انواع سویه های مقاوم و همچنین میزان بالای مقاومت در برابر اغلب آنتی بیوتیکها بود. بر این اساس، در میان آنتی بیوتیکهای بتالاکتامی، سویه های *اشرشیا کلای* مقاومت بالایی در برابر آمپی سیلین (۹۴ درصد)، سفوتاکسیم (۸۸ درصد)، سفپودوکسیم (۸۴ درصد)، سفتازیدیم (۸۳ درصد)، سفتریاکسون (۷۶ درصد) و آموکسی سیلین/کلاوولانیک اسید (۷۱ درصد) نشان دادند. از طرف دیگر، سویه ها از حساسیت بالایی در برابر مروپنم (۹۳ درصد)، پیپراسیلین/تازوباکتام (۹۱ درصد)، ایمی پنم (۸۹ درصد) و سفوکسی تین (۷۱ درصد) برخوردار بودند. در میان آنتی بیوتیکهای غیربتالاکتامی، میزان مقاومت سویه ها در برابر آنتی بیوتیکهای آمینوگلیکوزیدی آمیکاسین، جنتامایسین و کانامایسین به ترتیب ۳۳، ۳۳ و ۲۶ درصد بود و همچنین میزان مقاومت در برابر کینولونهای سیپروفلوکساسین، افلوکساسین و لووفلوکساسین نیز به ترتیب ۴۳، ۴۲ و ۳۹ درصد بود. علاوه بر این، ۴۹ درصد سویه ها نیز نسبت به سولفامتوکسازول/تری متوپریم مقاوم بودند (شکل ۱).



شکل ۱- درصد فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت.

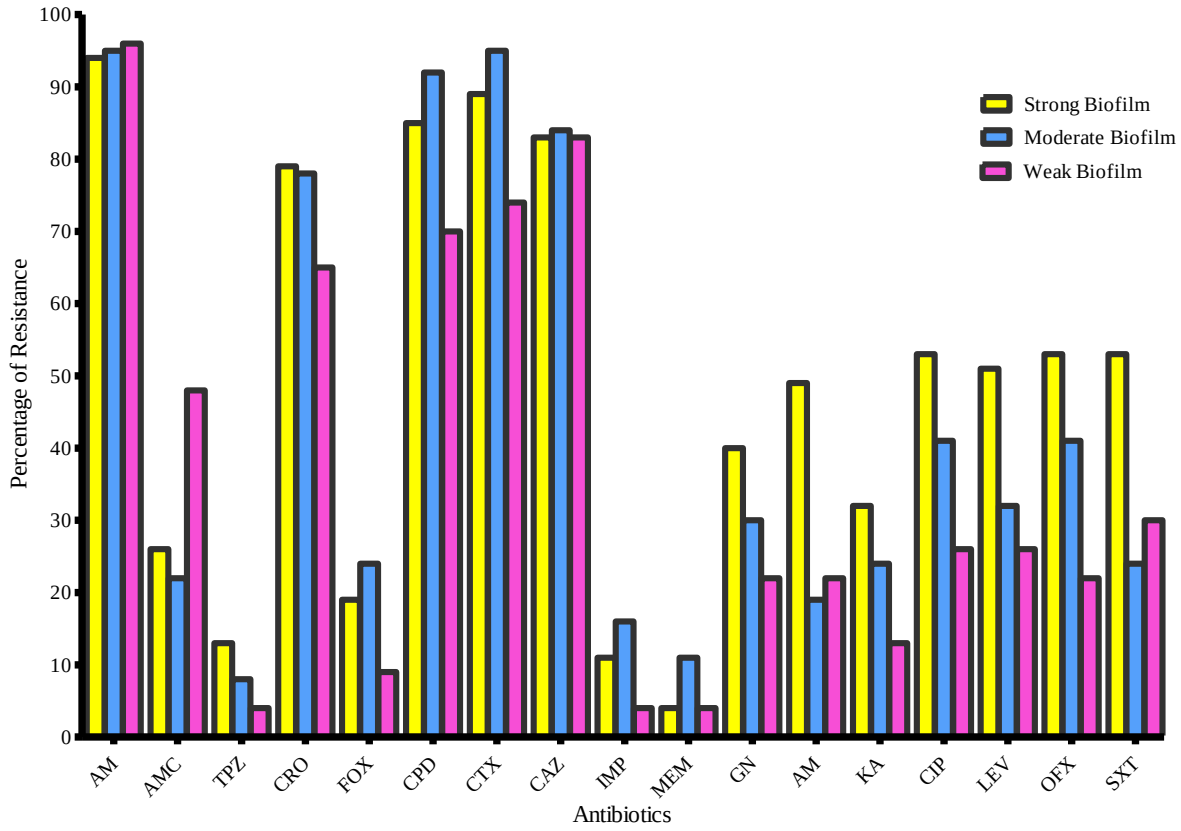
اختصارات عبارتند از: آمپی سیلین (AM)، آموکسی سیلین/کلاولانیک اسید (AMC)، پیپراسیلین/تازوباکتام (TPZ)، سفوتاکسیم (CTX)، سفتازیدیم (CAZ)، سفتریاکسون (CRO)، سفوکسی تین (FOX)، سفپودوکسیم (CPD)، ایمی پنم (IMP)، مروپنم (MEM)، جنتامایسین (GN)، آمیکاسین (AK)، کانامایسین (KA)، سیپروفلوکساسین (CIP)، افلوکساسین (OFX)، لووفلوکساسین (LEV) و سولفامتوکسازول/تری متوپریم (STX).

ارتباط میان توانایی تولید کورلای و سلولز و میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در میان سویه های بیوفیلم مثبت در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصل نشان دهنده عدم وجود اختلاف قابل توجه در میزان مقاومت مورفوتایپهای مختلف سویه های *اشرشیا کلای* بود. سویه های *اشرشیا کلای* واجد هر کدام از سه مورفوتایپ، در برابر آمپی سیلین، سفتریاکسون، سفپودوکسیم، سفوتاکسیم و سفتازیدیم با محدوده مقاومت ۷۳ تا ۱۰۰ درصد، دارای بالاترین میزان مقاومت و در برابر مروپنم با محدوده مقاومت ۰ تا ۱۱ درصد، دارای پایینترین میزان مقاومت بودند. میزان مقاومت آنتی بیوتیکی گروههای بیوفیلمی مختلف سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک در برابر آنتی بیوتیکهای مورد بررسی نشان دهنده وجود ارتباط مستقیم میان توانایی تولید بیوفیلم و میزان مقاومت آنتی بیوتیکی بود (شکل ۳). بر این اساس، میزان مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلم قوی در برابر اغلب آنتی بیوتیکهای آزمایش شده بالاتر از سویه های مولد بیوفیلم متوسط و ضعیف بود.



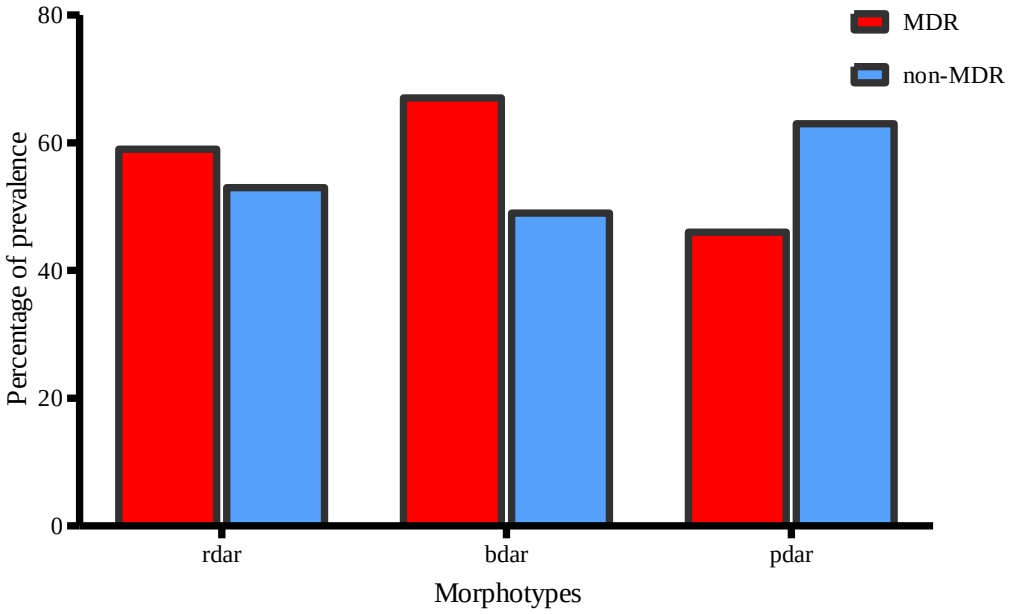
شکل ۲- مقاومت آنتی بیوتیکی در مورفوتایپهای مختلف سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت.
اختصارات عبارتند از: آمپی سیلین (AM)، آموکسی سیلین/کلاولانیک اسید (AMC)، پیپراسیلین/تازوباکتام (TPZ)، سفوتاکسیم (CTX)، سفتازیدیم (CAZ)، سفتریاکسون (CRO)، سفوکسی تین (FOX)، سفپودوکسیم (CPD)، ایمی پنم (IMP)، مروپنم (MEM)، جنتامایسین (GN)، آمیکاسین (AK)، کانامایسین (KA)، سیپروفلوکساسین (CIP)، افلوکساسین (OFX)، لووفلوکساسین (LEV) و سولفامتوکسازول/تری متوپریم (STX).

نتایج حاصل از بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت نشان داد که ۱۱ سویه (۲۸ درصد) به صورت همزمان در برابر حداقل ۳ کلاس مختلف از آنتی بیوتیکهای بررسی شده شامل سفالوسپورینها، آموکسی سیلین/کلاوولانیک اسید، سولفامتوکسازول/تری متوپریم، آمینوگلیکوزیدها و کینولونها مقاوم بودند و به عنوان سویه های *اشرشیا کلای* با فنوتایپ مقاومت دارویی چندگانه (MDR) در نظر گرفته شدند. بر اساس نتایج به دست آمده، مشخص گردید که فنوتایپ MDR در هر سه مورفوتایپ rdar، bdar و pdar پراکندگی نسبتاً یکسانی داشتند، که مؤید اهمیت ساختارهای کورلای و سلولز در مقاومت سویه های *اشرشیا کلای* بیوفیلم مثبت در برابر عوامل ضدمیکروبی است (شکل ۴). از طرف دیگر، وجود ارتباط مستقیمی میان توانایی تولید بیوفیلم و مقاومت دارویی چندگانه در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک شناسایی شد (شکل ۵)، به طوریکه فراوانی فنوتایپ MDR در سویه های بیوفیلم قوی (۵۸ درصد) به طور قابل توجهی ($P < 0.0001$) بالاتر از سویه های بیوفیلم متوسط (۲۹ درصد) و بیوفیلم ضعیف (۱۳ درصد) بود.

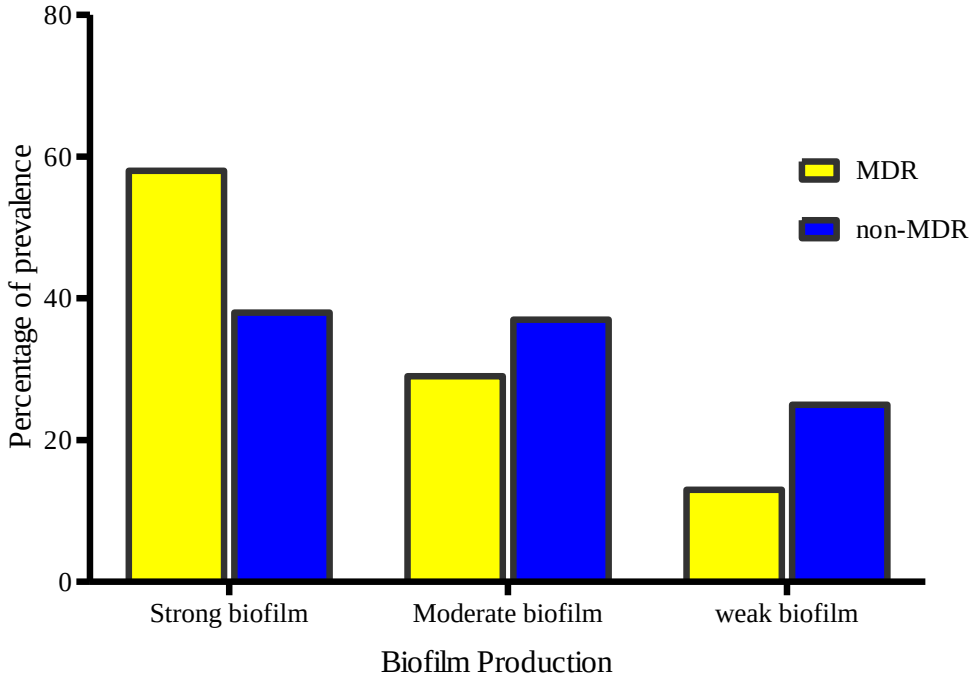


شکل ۳- مقاومت آنتی بیوتیکی در گروههای بیوفیلمی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت.

اختصارات عبارتند از: آمپی سیلین (AM)، آموکسی سیلین/کلاولانیک اسید (AMC)، پیپراسیلین/تازوباکتام (TPZ)، سفوتاکسیم (CTX)، سفتازیدیم (CAZ)، سفتریاکسون (CRO)، سفوکسی تین (FOX)، سفپودوکسیم (CPD)، ایمی پنم (IMP)، مروپنم (MEM)، جنتامایسین (GN)، آمیکاسین (AK)، کانامایسین (KA)، سیپروفلوکساسین (CIP)، افلوکساسین (OFX)، لووفلوکساسین (LEV) و سولفامتوکسازول/تری متوپریم (STX).



شکل ۴- مقاومت دارویی چندگانه در مورفوتایپهای مختلف سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت.



شکل ۵- مقاومت دارویی چندگانه در گروه های بیوفیلمی سویه‌های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت.

بحث

باکتری *اشرشیا کلای* جزئی از فلور طبیعی روده می باشد ولی برخی اوقات می تواند با خروج از روده و تهاجم به سایر بافتها سبب ایجاد عفونت گردد، بطوریکه کلونهای متعددی از *اشرشیا کلای* های کامنسال، ویژگیهای بیماریزایی اختصاصی کسب کرده‌اند که منجر به توانایی بیشتر این سویه ها برای ایجاد طیف وسیعی از بیماریها شده است (۲۵، ۲۶). سویه های بیماریزای خارج روده‌ای *اشرشیا کلای* به چندین پاتوتایپ تقسیم می شوند که سویه های پاتوتایپ اوروپاتوژنیک *اشرشیا کلای* با داشتن انواع متنوع از ساختاری اتصالی به نام فیمبریه، قادر به حمله و تکثیر در سلولهای اپیتلیال دستگاه ادراری می باشند که این امر آنها را به مهمترین عامل عفونتهای مجاری ادراری اکتسابی از جامعه (۷۰ تا ۹۵ درصد) و نیز بخش عمده ای از عفونتهای ادراری بیمارستانی (۵۰ درصد) مبدل نموده است (۳, ۲۷). توانایی تشکیل بیوفیلم از مهمترین عوامل بیماریزایی *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک محسوب می شود که در ایجاد عفونت ادراری و همچنین مقاومت آنتی بیوتیکی نقش بسیار مؤثری ایفا می کند. عفونتهای ادراری ایجاد شده توسط *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک اغلب به صورت تک گیر بوده که با تشخیص صحیح و سریع قابل درمان می باشند، اما گاهی اوقات این عفونتها به حالت عودشونده تبدیل می شوند که از دلایل اصلی آن، تشکیل بیوفیلم و ماندگاری طولانی مدت باکتری در روند عفونت است (۲۸). آنتی بیوتیکها، داروهای انتخابی در درمان عفونتهای ادراری می باشند، ولی امروزه به علت افزایش سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مقاوم، به ویژه سویه های با فنوتایپ مقاوم به چند دارو، نه تنها عفونتهای ادراری ناشی از این باکتری بهبودی نمی یابد، بلکه این عفونت از مخازن و منابع مهم گسترش باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک در بیمارستانها به شمار می رود (۲۹, ۳۰).

نتایج این تحقیق فراوانی بالای عفونتهای ادراری وابسته به *اشرشیا کلای* را نشان داد. شیوع بالای باکتری *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک به عنوان مهمترین عامل عفونتهای ادراری، در مطالعات مختلفی گزارش شده است (۳۱- ۳۳). قابلیت تشکیل بیوفیلم ارتباط تنگاتنگی با قدرت بیماریزایی سویه های *اشرشیا کلای* آلوده کننده مجاری ادراری دارد. در مطالعات زیادی اهمیت تشکیل بیوفیلم توسط *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک در عفونت مجاری ادراری اثبات شده است (۳۴, ۳۵). بر اساس مطالعات صورت گرفته بر روی ترکیب بیوشیمیایی بیوفیلم، کورلای جزء اصلی تشکیل دهنده بیوفیلم می باشد که همراه با آن سایر ترکیبات مانند سلولز، فلاژل و فیمبریه نوع ۱ باعث استحکام و حفظ ساختار سه بعدی بیوفیلم می شوند (۳۶). در این مطالعه، فراوانی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک تولیدکننده سلولز و کورلای ۲۳ درصد (۳۹ سویه) بود که در میان آنها، ۱۵ ایزوله (۳۸ درصد) با تولید همزمان کورلای و سلولز و تشکیل کلنیهایی با مورفوتایپ rdar، توانایی بالایی در تولید بیوفیلم نشان دادند. به طور کلی، در این تحقیق با توجه به نتایج آزمون ژلوز قرمز کنگو، فراوانی سویه های *اشرشیا کلای* تولیدکننده کورلای از سویه های تولیدکننده سلولز بالاتر بود که مشابه نتایج تحقیق Bokranz و همکاران (۳۷) بر روی ایزوله های *اشرشیا کلای* ادراری بود. در میان ۳۹ سویه *اشرشیا کلای* بیوفیلم مثبت این مطالعه در آزمون میکروتیتر پلیت، ۷ سویه (۱۸ درصد) بیوفیلم قوی، ۱۰ سویه (۲۶ درصد) بیوفیلم متوسط و ۲۲ سویه (۵۶ درصد) بیوفیلم ضعیف تولید کردند. در این مطالعه اغلب سویه های بیوفیلم مثبت *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، در گروه بیوفیلم متوسط و قوی قرار گرفتند که مؤید نقش و اهمیت بیوفیلم در بیماریزایی این باکتری می باشد و در مطالعات Soto و همکاران (۹) و Naves و همکاران (۳۸) نیز تأیید شده است. در مطالعه تاجبخش و همکاران (۳۹)، از ۱۳۰ ایزوله *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک، ۸۱ ایزوله (۶۱/۵۳ درصد) قادر به تولید بیوفیلم بودند که ۱۵ (۱۸/۷۵ درصد)، ۲۰ (۲۵ درصد) و ۴۵ (۵۶/۲۵ درصد) ایزوله به ترتیب قادر به تولید بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف بودند. زمانی و همکاران (۳۴) نیز ۸۴ درصد ایزوله های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک را مولد بیوفیلم متوسط تا قوی گزارش کردند. تفاوت در فراوانی ایزوله های بیوفیلم مثبت در مطالعات مختلف می تواند به علت اختلاف در سطح بهداشت، مقاومت آنتی بیوتیکی، منبع جداسازی نمونه ها، محدوده زمانی نمونه گیری و خصوصیات بالینی افراد بیمار باشد.

در مطالعه حاضر نتایج مؤید وجود هماهنگی و ارتباط مستیقم میان تولید کمی بیوفیلم با تولید سلولز و کورلای در روش کیفی ژلوز قرمز کنگو بودند. بر این اساس مشخص گردید که تمام سویه های با مورفوتایپهای rdar، bdar و pdar در گروه بیوفیلم مثبت و تمامی سویه های با مورفوتایپ saw نیز در گروه بیوفیلم منفی قرار داشتند. در مطالعه Ponnusamy و همکاران در سال ۲۰۱۲ (۴۰)، تشکیل بیوفیلم با روشهای ژلوز قرمز کنگو و میکروتیتر پلیت در میان ۱۰۰ ایزوله *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک مورد سنجش قرار گرفت که در روش ژلوز قرمز کنگو فراوانی گروههای بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف به ترتیب ۲۳، ۳۷ و ۴۰ درصد بود، اما در آزمون میکروتیتر پلیت؛ ۶ درصد ایزوله ها واجد بیوفیلم قوی، ۸۰ درصد واجد بیوفیلم متوسط و ۱۴ درصد نیز واجد بیوفیلم ضعیف گزارش شدند. علاوه بر این، مقایسه توانایی کمّی

تولید بیوفیلم با موفوتایپهای مختلف در این مطالعه، مؤید ارتباط قابل توجه بین گروه بیوفیلم قوی و متوسط با مورفوتایپ rdar بود؛ به طوریکه ۱۰۰ و ۶۰ درصد سویه های به ترتیب بیوفیلم قوی و متوسط واجد مورفوتایپ rdar (کورلای + و سلولز +) بودند. از طرف دیگر، ۸۶ درصد سویه های bdar و همچنین تنها ایزوله pdar در گروه بیوفیلم ضعیف قرار داشتند. اهمیت حضور کورلای و سلولز برای تشکیل بیوفیلم در مطالعه Saldana و همکاران (۴۱) نیز گزارش شده است، به طوریکه در مطالعه آنها نیز، اغلب سویه های *اشرشیا کلای* واجد کورلای و سلولز توانایی تولید بیوفیلم قوی داشتند.

عوامل بیماریزایی موجود در سطح سلول سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، شامل انواع مختلفی از عوامل اتصالی هستند که باعث تسهیل تهاجم به میزبان و ایجاد برهمکنشهای بین باکتریایی به منظور تشکیل بیوفیلم می‌باشند (۴۲). ساختارهای اختصاصی موجود در بیوفیلم، به ویژه حضور ماتریکسی فشرده در اطراف باکتریها، باعث حفاظت از باکتری در برابر عوامل ضدمیکروبی و سازوکارهای دفاعی میزبان شده که منجر به ایجاد عفونتهای مزمن و پایدار و مشکلات درمانی عفونتهای حاصل از بیوفیلم می شود، بطوریکه تشکیل بیوفیلم می تواند تا بیش از ۱۰۰۰ برابر مقاومت باکتری را در برابر کلاسهای مختلف آنتی بیوتیکی نسبت به حالت منفرد، افزایش دهد (۲۹، ۴۳). از طرف دیگر، سویه های *اشرشیا کلای* موجود در بیوفیلم با داشتن عوامل مقاومت مختلف، می توانند به عنوان یک مخزن مهم حاوی عوامل ژنتیکی مقاومت، باعث انتقال و گسترش مقاومت به سویه های همزیست *اشرشیا کلای* و همچنین سایر باکتریهای بیماریزا می شوند (۱۳). خصوصیات منحصر به فرد موجود در ساختار بیوفیلم از جمله جلوگیری از انتشار دارو با واسطه حضور ماتریکسی فشرده در اطراف باکتریها، افزایش میزان انتقال افقی ژنهای مقاومت بین باکتریهای بیوفیلم و وجود عوامل غیرفعال کننده آنتی بیوتیکها مانند تغییر غلظت یونهای فلزی یا تغییر در میزان pH محیط، در مجموع باعث افزایش میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در بیوفیلمهای باکتریایی شده است (۴۴). بر این اساس ارتباط مستقیم میان کمّیت و کیفیت تولید بیوفیلم در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک با میزان مقاومت به کلاسهای آنتی بیوتیکی مختلف، در مطالعات متعددی گزارش شده است (۲۹، ۳۰). بنابراین بررسی و تشخیص بیوفیلم و استفاده از روشهای مناسب و سریع برای غربالگری باکتریهای مولد بیوفیلم بسیار ضروری است و می تواند به انتخاب راهکار درمانی مناسب و پیشگیری از عود عفونت کمک کند و همچنین از ایجاد مشکلات ادراری شدید مانند پیلونفریت و پروستاتیت جلوگیری نماید.

اساس درمان مناسب در عفونتهای ادراری، انتخاب یک آنتی بیوتیک مناسب با کارآیی و اثربخشی بالا می باشد. با توجه به افزایش روزافزون مصرف آنتی بیوتیکها و متعاقب آن افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی و متفاوت بودن حساسیت سویه های *اشرشیا کلای* جداسازی شده در هر منطقه، مطالعه بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری کاملا ضروری است. اولین آنتی بیوتیکهای مورد استفاده در درمان عفونتهای ادراری، کینولونها و فلوروکینولونها بوده اند، ولی بررسیهای اخیر در سراسر ایالات متحده و اروپا، افزایش میزان مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک در برابر تری متوپریم، سولفومتوکسازول و فلئوروکینولونها از جمله سیپروفلوکساسین را نشان داده است (۱۵، ۴۵). همچنین افزایش مقاومت سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک در برابر آنتی بیوتیکهای بتالاکتام، به ویژه سفالوسپورینهای وسیع الطیف و کارباپنمها در سراسر دنیا گزارش شده است، که البته تفاوتهای جغرافیایی قابل توجهی در اپیدمیولوژی و شیوع انواع مختلف سازوکارهای مقاومت وجود دارد (۴۶، ۴۷). در این مطالعه نیز سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت، مقاومت قابل ملاحظه ای نسبت به اغلب آنتی بیوتیکها نشان دادند، به طوریکه بیش از ۹۹ درصد سویه ها در برابر حداقل یکی از آنتی بیوتیکهای مورد بررسی، مقاوم بودند که در میان آنها، ۶۷ درصد به ۶ تا ۱۵ آنتی بیوتیک مقاومت نشان دادند که این میزان بالا و تنوع زیاد مقاومت آنتی بیوتیکی، آنها را به یک عامل خطر مهم در بهداشت عمومی این مناطق تبدیل کرده است. طی تحقیقات صورت گرفته در ایران، بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک جداسازی شده از بیمارستانهای ایران مربوط به آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین (۸۰/۲٪)، تری متوپریم/سولفامتوکسازول (۷۶٪)، تتراسایکین (۷۰/۸٪)، نالیدیکسیک اسید (۲۴/۵٪) و جنتامایسین (۱۵/۴٪) بوده است (۴۸، ۴۹). اگرچه به طور معمول جهت درمان عفونتهای ادراری، از درمان ضدمیکروبی تجربی استفاده می شود، اما با توجه به افزایش روزافزون مصرف آنتی بیوتیک و متعاقب آن افزایش مقاومت به آنتی بیوتیکها و متفاوت بودن حساسیت سویه های جداسازی شده در هر منطقه، آگاهی از داده های اپیدمیولوژیک و میزان شیوع مقاومت ضدمیکروبی در هر منطقه، به منظور درمان تجربی مؤثر و مفید و همچنین ارزیابی دستورالعملهای موجود بسیار ضروری و حائز اهمیت است.

در این مطالعه بیش از ۵۰ درصد از سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، در برابر آمپی سیلین و آنتی بیوتیکهای سفالوسپورینی، کینولونی و سولفامتوکسازول/تری متوپریم مقاوم بودند که این میزان مقاومت بالا در سایر مطالعات نیز ارائه شده است (۴۷-۴۹). علاوه بر آن، نتایج آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی در این مطالعه، نشان دهنده وجود مقاومت همزمان قابل توجه، میان آمپی سیلین، سفالوسپورینها، کینولونها و سولفامتوکسازول/تری متوپریم بود؛ که مؤید عدم کارآیی این کلاسهای آنتی بیوتیکی و بی اثر بودن استفاده ترکیبی از این داروها جهت درمان عفونتهای ادراری می باشد. بر اساس گزارشهای منتشر شده، آنتی بیوتیکهای آمینوگلیکوزیدی از جمله کلاسهای آنتی بیوتیکی می باشند که فعالیت مهاری نسبتا مناسبی بر روی سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک دارند (۵۰، ۵۱). یافته های این مطالعه نیز نشان داد که آمینوگلیکوزیدها می توانند به عنوان داروهای انتخابی با تأثیر نسبتاً مناسب در درمان عفونت ادراری مورد استفاده قرار گیرند، به طوریکه حساسیت نسبتاً بالایی نسبت به آنتی بیوتیکهای جنتامایسین (۶۷ درصد)، آمیکاسین (۶۷ درصد) و کانامایسین (۷۵ درصد) وجود داشت و بر این اساس می توان این کلاس آنتی بیوتیکی را به عنوان خط اول درمان تجربی پیشنهاد کرد. از طرف دیگر کمترین میزان مقاومت همزمان در این مطالعه، میان آمینوگلیکوزیدها با کارباپنمها و سولفامتوکسازول/تری متوپریم وجود داشت که بر این اساس، استفاده ترکیبی از آنها را در موارد عفونتهای شدید امکانپذیر می سازد. با وجود اینکه در سالیان اخیر سویه های ادراری مقاوم به کارباپنمها شیوع یافته اند، اما این کلاس آنتی بیوتیکی شامل ایمی پنم و مروپنم به عنوان درمان ثانویه برای سویه های با مقاومت چندگانه و عفونتهای ادراری پیچیده حائز اهمیت می باشد. در این مطالعه نیز همانند سایر مطالعات در ایران و سایر مناطق دنیا (۵۲، ۵۳)، اغلب سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک، در برابر ایمی پنم (۸۹ درصد) و مروپنم (۹۳ درصد) حساس بودند. این حساسیت بالا ممکن است به علت عدم عرضه عمومی و همچنین پایداری آنها در برابر تجزیه شدن توسط اغلب بتالاکتامازها باشد و به همین دلیل این آنتی بیوتیکها امروزه به عنوان یک عامل انتخابی جهت درمان عفونتهای حاصل از سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک تولیدکننده آنزیمهای بتالاکتامازی توصیه می شوند. با این وجود در استفاده درمانی از کارباپنمها بایستی احتیاط کرد، چرا که مقاومت به آنها در باکتریهای گرم منفی حاوی آنزیمهای بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL)، به سرعت در حال افزایش است. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در این مطالعه شباهت بسیار زیادی با یافته های محمدزاده و همکاران (۴۸)، وکیل زاده و همکاران (۴۹) و Azap و همکاران (۵۴) داشت که مقاومت بالا به سفالوسپورینهای نسل سوم، کینولونها و سولفامتوکسازول/تری متوپریم و حساسیت بالا به کارباپنمها را در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک گزارش کردند.

سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک انواع مختلفی از پلاسمیدهای مقاومت را حمل می کنند و از توانایی بالایی جهت کسب فنوتایپ با مقاومت دارویی چندگانه (MDR) برخوردار می باشند. در این مطالعه، بر اساس مقاومت به حداقل ۳ کلاس آنتی بیوتیکی مختلف؛ ۱۱ سویه *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک (۲۸ درصد) به عنوان MDR در نظر گرفته شدند. فراوانی ایزوله های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک با مقاومت دارویی چندگانه از نقاط مختلف ایران، ۱۱ تا ۶۵ درصد گزارش شده است (۱۵، ۵۵). رایجترین الگوی MDR در میان سویه های *اشرشیا کلای* در این مطالعه، بتالاکتام+کینولون+سولفامتوکسازول/تری متوپریم (۳۲ درصد) بود که احتمال تولید آنزیمهای هیدرولیزکننده بتالاکتامی توسط این سویه ها را نشان می دهد. علاوه بر این، در این مطالعه ارتباط قابل توجهی میان توانایی تولید بیوفیلم و MDR مشاهده شد، به طوریکه فراوانی MDR در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم قوی (۵۸ درصد)، به طور قابل توجهی بالاتر از سویه های بیوفیلم ضعیف (۱۳ درصد) بود. ساختار اختصاصی موجود در بیوفیلم، به ویژه حضور ماتریکسی فشرده در اطراف باکتریها، باعث افزایش مقاومت باکتری به آنتی بیوتیکها و عوامل ضدمیکروبی می شود. مطالعات نظارتی انجام شده نیز افزایش سطح مقاومت سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم را به کلاسهای آنتی بیوتیکی اصلی نشان داده است.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، اغلب سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت، واجد توانایی تولید همزمان کورلای و سلولز و همچنین تولید بیوفیلم قوی بودند که نشانگر سازگاری آنها در جهت تشکیل مستحکمترین ساختار بیوفیلمی به منظور مقابله در برابر مجموعه سازوکارهای ایمنی ذاتی و اختصاصی موجود در دستگاه ادراری و همچنین مقاومت حداکثری نسبت به آنتی بیوتیکها می باشد. بسیاری از عفونتهای ادراری ایجاد شده توسط *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک به صورت عودشونده بروز می کنند که نتیجه تشکیل بیوفیلم و مقاوم شدن باکتری به شرایط نامساعد محیطی است. بنابراین بررسی و تشخیص بیوفیلم ایجاد شده

توسط *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنتیک و استفاده از درمان صحیح و اصولی عفونتهای ادراری می تواند کمک شایانی به حذف و ریشه کنی عامل مولد عفونت و جلوگیری از تشکیل عفونتهای عودشونده نماید. تشکیل بیوفیلم در *اشرشیا کلای* ارتباط تنگاتنگی با مقاومت ضدمیکروبی و همچنین پایداری و عود عفونتهای ادراری دارد. شیوع نسبتاً بالای سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم و مقاومت ضدمیکروبی بسیار بالای این سویه ها، از یافته های اصلی این مطالعه بود. از طرف دیگر، نتایج این تحقیق ارتباط میان توانایی کیفی و کمّی تولید بیوفیلم با مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک را آشکار کرد. همچنین، ارتباط قابل توجهی میان تولید بیوفیلم و ظهور MDR مشاهده شد که یکی از نگرانیهای مهم در بهداشت عمومی است که نیازمند توجه بیشتری خواهد بود. در کنار حساسیت بالای سویه های *اشرشیا کلای* به کارباپنمها؛ در این مطالعه آمینوگلیکوزیدها به عنوان مفیدترین داروهای خط اول درمانی معین شدند. از طرف دیگر، مقاومت همزمان معنی داری بین اغلب کلاسهای آنتی بیوتیکی در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مشاهده شد که بیشتر این سویه ها، مولد بیوفیلم قوی و MDR بودند که امروزه این موضوع یکی از چالشهای بالینی بسیار خطرناک محسوب می شود. به طور کلی، یافته های این تحقیق، شواهد نگران کننده ای از افزایش خطرناک شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی با پتانسیل انتشار MDR در سویه های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک در اصفهان را نشان داد که محدود کردن انتشار مقاومت آنتی بیوتیکی نیازمند اتخاذ تمهیدات مؤثری جهت استفاده صحیح از آنتی بیوتیکها و یافتن راهکارهای درمانی جدید در برابر سویه های مولد بیوفیلم می باشند.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از پایان نامه دکتری آقای علی قاسمی است که با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان و صندوق حمایت از پژوهشگران (طرح مصوب شماره ۹۷۰۱۴۸۴۵) به انجام رسیده است.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ تضاد منافعی در رابطه با نویسندگی و یا انتشار این مقاله ندارند.

REFERENCE

1. Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. American Journal of Medicine. 2002;113:14-9.
2. Sobel J, Kaye D. Urinary treat infections. 5th ed. Mandell G, Bennet J, Dolin R, editors. New Yourk: Churchil-Livingstone; 2000.
3. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nature Reviews Microbiology. 2015;13(5):269-84.
4. Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection. Nature Reviews Urology. 2010;7:653-60.
5. Stammand W.E, Hooton T.M. Management of urinary tract infections in adults. New England Journal of Medicine. 1993;29(18):1328-34.
6. Soto SM, Smithson A, Horcajada J.P, Martinez J.A, Mensa J.P, Vila J. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic Escherichia coli. Clinical Microbiology and Infection. 2006;12(10):1034-6.

7. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic Escherichia coli. Nature Reviews Microbiology. 2014;2:123-40.
8. Klein RD, Hultgren SJ. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. Nature Reviews Microbiology. 2020;18(4):211-26.
9. 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. Journal of Urology. 2007;177(1):365-8.
10. Reisner A, Haagensen JA, Schembri MA, Zechner EL, Molin S. Development and maturation of Escherichia coli K-12 biofilms. Molecular Microbiology. 2003;48(4):933-46.
11. Mah T-FC, O'toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology. 2001;9(1):34-9.
12. Post JC, Stoodley P, Hall–Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery. 2004;12(3):185-90.
13. Kot B. Antibiotic Resistance Among Uropathogenic Escherichia coli. Polish Journal of Microbiology. 2019;68(4):403-15.
14. Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. Current Opinion in Pharmacology. 2006;6:468-72.
15. Alizade H. Escherichia coli in Iran: An Overview of Antibiotic Resistance: A Review Article. Iranian Journal of Public Health. 2018;47(1):1-12.
16. Rawat D, Nair D. Extended-spectrum β-lactamases in Gram negative bacteria. Journal of Global Infectious Diseases. 2010;2(3):263-74.
17. Khoshnood S, Heidary M, Mirnejad R, Bahramian A, Sedighi M, Mirzaei H. Drug-resistant gram-negative uropathogens: A review. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017;94:982-94.
18. Sharma M, Aparna D, Yadav S, Chaudhary U. Biofilm production in uropathogenic Escherichia coli. Indian Journal of Pathology & Microbiology. 2009;52:294.
19. MacFaddin J.F. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 2000.
20. Vareille M, de Sablet T, Hindré T, Martin C, Gobert AP. Nitric oxide inhibits shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007;104(24):10199-204.
21. Römling U, Bian Z, Hammar M, Sierralta WD, Normark S. Curli fibers are highly conserved between Salmonella typhimurium and Escherichia coli with respect to operon structure and regulation. Journal of Bacteriology. 1998;180(3):722-31
22. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. Journal of Visualized Experiments. 2011;30(47):2437.
23. Clinical and Laboratory Standard Institute C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th informational supplement. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa. 2018.
24. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clinical Microbiology Infection. 2012;18(3):268-81.
25. Sora VM, Meroni G, Martino PA, Soggiu A, Bonizzi L, Zecconi A. Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. Pathogens. 2021;10(11):1355.
26. Tanabe RHS, Dias RCB, Orsi H, de Lira DRP, Vieira MA, Dos Santos LF, Ferreira AM, Rall VLM, Mondelli AL, Gomes TAT, Camargo CH, Hernandes RT. Characterization of Uropathogenic Escherichia coli Reveals Hybrid Isolates of Uropathogenic and Diarrheagenic (UPEC/DEC) E. coli. Microorganisms. 2022;10(3):645.
27. Manges A, Geum H, Guo A, Edens T, Fibke C, Pitout J. Global Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli (ExPEC(Lineages. Clinical Microbiology Reviews. 2019;32(3):1-25.

28. Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, et al. Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies. Journal of Applied Microbiology. 2016;121(2):309-19.
29. Bowler P, Murphy C, Wolcott R. Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship? Antimicrobial Resistance Infection Control. 2020; 162 (9).
30. Abdelhamid AG, Yousef AE. Combating Bacterial Biofilms: Current and Emerging Antibiofilm Strategies for Treating Persistent Infections. Antibiotics. 2023;12(6):1005.
31. Whelan S, Lucey B, Finn K. Uropathogenic Escherichia coli (UPEC)-Associated Urinary Tract Infections: The Molecular Basis for Challenges to Effective Treatment. Microorganisms. 2023;11(9):2169.
32. Pourmontaseri Z, Pourmontaseri M, Baziboroun M, Jorjani M, Bakhshizadeh S. Distribution and Antimicrobial Resistance Patterns of Urinary Tract Infection in Southern Iran. International Journal of Nutritional Sciences. 2018;3(2):113-119.
33. Habibi-Asl B, Asghari R, Ahangarzadeh Rezaee M, Mohammad-Zadeh A, Abri R. Evaluation of etiologic agents and antimicrobial resistance pattern of urinary tract infections in the northwest of Iran. Journal of Analytical Research in Clinical Medicine. 2018;6(1):7-12.
34. Zamani H, Salehzadeh A. Biofilm formation in uropathogenic Escherichia coli: association with adhesion factor genes. Turkish Journal of Medical Sciences. 2018;48(1):162-167.
35. Whelan S, O'Grady MC, Corcoran D, Finn K, Lucey B. Uropathogenic Escherichia coli Biofilm-Forming Capabilities are not Predictable from Clinical Details or from Colonial Morphology. Diseases. 2020;8(2):11.
36. Hung C, Zhou Y, Pinkner JS, Dodson KW, Crowley JR, Heuser J, et al. Escherichia coli biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure. mBio. 2013;4(5):e00645-13.
37. Bokranz W, Wang X, Tschäpe H, UR. Expression of cellulose and curli fimbriae by Escherichia coli isolated from the gastrointestinal tract. Journal of Medical Microbiology. 2005;54(12):1171-82.
38. Naves P, del Prado G, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, Blanco J, et al. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by Escherichia coli strains. Microbial Pathogenesis. 2008;45(2):86-91.
39. 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 and Infection Control. 2016;1(5):11.
40. Ponnusamy P, Natarajan V, M S. In vitro biofilm formation by uropathogenic Escherichia coli and their antimicrobial susceptibility pattern. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2012;5(3):210-3.
41. Saldaña Z, Xicohtencatl-Cortes J, Avelino F, Phillips AD, Kaper JB, Puente JL, et al. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing Escherichia coli and identification of Fis as a negative regulator of curli. Environmental Microbiology. 2009;11(4):992-1006.
42. Ballén V, Cepas V, Ratia C, Gabasa Y, Soto SM. Clinical Escherichia coli: From Biofilm Formation to New Antibiofilm Strategies. Microorganisms. 2022;10(6):1103.
43. McCrate OA, Zhou X, Reichhardt C, Cegelski L. Sum of the parts: composition and architecture of the bacterial extracellular matrix. Journal of Molecular Biology. 2013;425(22):4286-94.
44. Abou Heidar NF, Degheili JA, Yacoubian AA, Khauli RB. Management of urinary tract infection in women: A practical approach for everyday practice. Urology Annals. 2019;11(4):339-46.
45. Bader MS, Loeb M, Leto D, Brooks AA. Treatment of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance and new antimicrobial agents. Postgraduate Medical Journal. 2020;132(3):234-50.
46. Sahoo KC, Tamhankar AJ, Sahoo S, Sahu PS, Klintz SR, Lundborg CS. Geographical variation in antibiotic-resistant Escherichia coli isolates from stool, cow-dung and drinking water. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2012;9(3):746-59.

47. Lob SH, Nicolle LE, Hoban DJ, Kazmierczak KM, Badal RE, Sahm DF. Susceptibility patterns and ESBL rates of Escherichia coli from urinary tract infections in Canada and the United States, SMART 2010-2014. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2014;85(4):459-65.
48. Mohammadzadeh M, Tavakoli M, Yaslianifard S, Asadi E, Golmohammadi R, Mirnejad R. Genetic diversity and antibiotic susceptibility of uropathogenic Escherichia coli isolates from kidney transplant recipients. Infection and Drug Resistance. 2019;12:1795-803.
49. Vakilzadeh MM, Heidari A, Mehri A, Shirazinia M, Sheybani F, Aryan E, et al. Antimicrobial Resistance among Community-Acquired Uropathogens in Mashhad, Iran. Journal of Environmental and Public Health. 2020;2020:3439497.
50. Kot B. Antibiotic Resistance Among Uropathogenic Escherichia coli. Polish Journal of Microbiology. 2019;68(4):403-415.
51. Soleimani N, Aganj M, Ali L, Shokoohizadeh L, Sakinc T. Frequency distribution of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes in uropathogenic E. coli isolated from Iranian hospital. BMC Research Notes. 2014;7:842.
52. Zhang H, Kong H, Yu Y, Wu A, Duan Q, Jiang X, Zhang Sh, et al. Carbapenem susceptibilities of Gram-negative pathogens in intra-abdominal and urinary tract infections: updated report of SMART 2015 in China. BMC Infectious Diseases. 2018;18(1):493.
53. Shams S, Hashemi A, Esmkhani M, Kermani S, Shams E, Piccirillo A. Imipenem resistance in clinical Escherichia coli from Qom, Iran. BMC Research Notes. 2018;11(1):314.
54. Azap OK, Arslan H, Serefhanoğlu K, Colakoğlu S, Erdoğan H, Timurkaynak F, et al. Risk factors for extended-spectrum beta-lactamase positivity in uropathogenic Escherichia coli isolated from community-acquired urinary tract infections. Clinical Microbiology and Infection. 2010;16(2):147-51.
55. Ramos NL, Dzung DT, Stopsack K, Jankó V, Pourshafie MR, Katouli M, et al. Characterisation of uropathogenic Escherichia coli from children with urinary tract infection in different countries. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2011;12:1587-93.