Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 3 (July - August)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

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

Nafiseh Nosrati[1], Sahar Honarmand Jahromy[1], Shohreh Zare Karizi[2]

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

Article Information

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

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 2017; 11(3): 49-58

Corresponding author:

Dr. Sahar Honarmand Jahromy

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

Tel: 0989124364257

Email:
sahar_hj2@yahoo.com

Abstract

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

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

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

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

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

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

Final

How to cite this article:

Nosrati N, Honarmand Jahromy S, Zare Karizi S. Comparison of Tissue Culture Plate, Congo red Agar and Tube Methods for Evaluation of Biofilm Formation among *Uropathogenic E. coli* Isolates. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (3): 49-58

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۳ – مرداد و شهریور ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

مقایسه روش‌های صفحه کشت بافت، کنگورد آگار و لوله برای سنجش بیوفیلم *اشریشیا کلی یوروپاتوژن*

نفیسه نصرتی[۱]، سحر هنرمند جهرمی[۱]، شهره زارع کاریزی[۲]

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

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

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۲۷

پذیرش:۱۳۹۶/۰۴/۱۸

انتشار آنلاین:۱۳۹۶/۰۵/۱۷

موضوع:

باکتری‌شناسی پزشکی

IJMM 1396; 11(3): 49-58

نویسنده مسئول:

دکتر سحر هنرمند جهرمی

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

تلفن: ۰۹۸۹۱۲۴۳۶۴۲۵۷

پست الکترونیک:

sahar_hj2@yahoo.com

چکیده

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

مواد و روش کار: ۱۰۰ جدایه *اشریشیا کلی یوروپاتوژن* از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری مراجعه کننده به بیمارستان میلاد تهران در سال ۱۳۹٤ جمع‌آوری شد. تشخیص جدایه ها توسط تست‌های بیوشیمیایی و توانایی تشکیل بیوفیلم به وسیله روش‌های صفحه کشت بافت، کنگورد آگار و لوله تعیین شد. حساسیت و ویژگی روش‌ها ارزیابی شد.

یافته‌ها: درروش لوله ۲۳٪ و ۵۹٪ جدایه ها دارای بیوفیلم قوی و بیوفیلم ضعیف بودند. در روش کشت بافت ٤۰٪، ۲۲٪ و ۲۸٪ جدایه ها به ترتیب بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف تشکیل دادند و ۱۰٪ بیوفیلم منفی بودند. با روش کنگورد آگار تنها ٤٪ سویه‌ها بیوفیلم قوی داشتند، ٦۵٪ و ۳۱٪ به ترتیب بیوفیلم ضعیف و فاقد بیوفیلم بودند. حساسیت روش‌های کنگورد آگار و لوله به ترتیب ۳۹/۱٪ و ۵۰/۹٪ و ویژگی آن‌ها به ترتیب ۷۸/۳٪ و ۷۹/۷٪ به دست آمد.

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

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

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

مقدمه

بیوفیلم ها جمعیت‌های میکروبی هستند که به یکدیگر و بر روی سطوح می‌چسبند و توسط یک ماتریکس پلیمری خارج سلولی که خود می‌سازند، احاطه می‌شوند (۱). بیوفیلم های باکتریایی در همه‌جا حضور دارند و می‌توانند در مکان‌ها یا زیستگاه‌های مختلفی یافت شوند. آن‌ها می‌توانند متشکل از یک یا چندگونه مختلف باکتریایی باشند که قادرند ساختارهای پیچیده‌ای را بسازند. تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های بیماری‌زا بر روی بافت‌ها یا ابزارهای پزشکی و کار گذاشته‌شده در بدن میزبان، اغلب منجر به بروز عفونت‌هایی می‌شود که مقاومت بالایی به ترکیبات ضد میکروبی و پاسخ‌های میزبانی نشان می‌دهند (۲). مطالعات نشان داده که بیوفیلم های باکتریایی عامل ۸۰٪ موارد عفونت‌های میکروبی هستند که ریشه‌کنی و درمان آنتی‌بیوتیکی آن‌ها بسیار دشوار است (۳). بیوفیلم های باکتریایی نقش عمده‌ای در شکل‌گیری عفونت‌های بیمارستانی و عفونت مجاری ادراری دارند و سبب بروز عفونت‌های مکرر می‌گردند که باعث برگشت بیماری و بروز پروستاتیت حاد

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

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی جدایه های اشریشیاکلی یوروپاتوژن

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

تشخیص تولید بیوفیلم در جدایه های اشریشیا کلی یوروپاتوژن

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

روش صفحه کشت بافت (TCP)

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

Final Proof

مقطر استریل شسته شدند. چاهک‌ها جهت بررسی نتایج با دستگاه خوانش (ELISA reader Citation 3,Biotek.USA) و در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر، با ۱۰۰ میکرولیتر محلول اسید استیک گلاسیال ۳۳٪ پر شدند (۱۴). جهت بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم سویه‌ها، از روش تعیین معیار طبقه‌بندی مقادیر جذب نوری یا ODc (Optical Density cut-off value) استفاده شد(۱۵). ODc از رابطه میانگین OD کنترل منفی به اضافه ۳ برابر انحراف معیار کنترل منفی به دست آمد. سویه‌ها بر اساس جدول۱ ازنظر بیوفیلم به چهار گروه تقسیم شدند.

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

روش کنگو رد آگار (CRA)

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

روش کدورت در لوله (TM)

پس از تهیه محیط تریپتیکاز سوی آگار (Merck, Germany)، باکتری‌های *اشریشیا کلی* در محیط، کشت داده‌شده و پس از ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، سوسپانسیون باکتری تهیه شد. سپس یک لوپ کامل از سوسپانسیون باکتری به لوله حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط تریپتیکاز سوی براث همراه گلوکز ۲٪ منتقل شد. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شدند. بعدازآن محتویات لوله‌ها را خارج کرده و با محلول بافر فسفات (pH 7.3) شستشو داده شد و پس از خشک شدن لوله‌ها با کریستال ویوله ۱٪ رنگ‌آمیزی شدند. رنگ اضافه به‌وسیله آب مقطر استریل شستشو داده شد. لوله‌ها به‌صورت وارونه قرار داده‌شده تا خشک شوند. نتایج مربوط به جدایه های *اشریشیاکلی* یوروپاتوژن تشکیل‌دهنده اسلایم یا بیوفیلم بر اساس ضخامت رنگ کریستال ویوله بر روی ته و جداره لوله به به‌صورت مشاهده یک‌لایه نازک قابل‌رؤیت در کنار بدنه و ته لوله، بیوفیلم متوسط (Moderate) در نظر گرفته شد. مشاهده لایه ضخیم قابل‌رؤیت در کنار بدنه و ته لوله، بیوفیلم قوی (Strong) در نظر گرفته شد و فقدان لایه قابل‌رؤیت در کنار بدنه و ته لوله بیوفیلم منفی در نظر گرفته شد (۱۷). آزمایش در سه تکرار انجام شد.

آنالیز آماری

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

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

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

یافته‌ها

فراوانی جدایه های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن در نمونه ادرار بیماران

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

Final Proof

تولید بیوفیلم در جدایه‌های *اشریشیاکلی یوروپاتوژن*

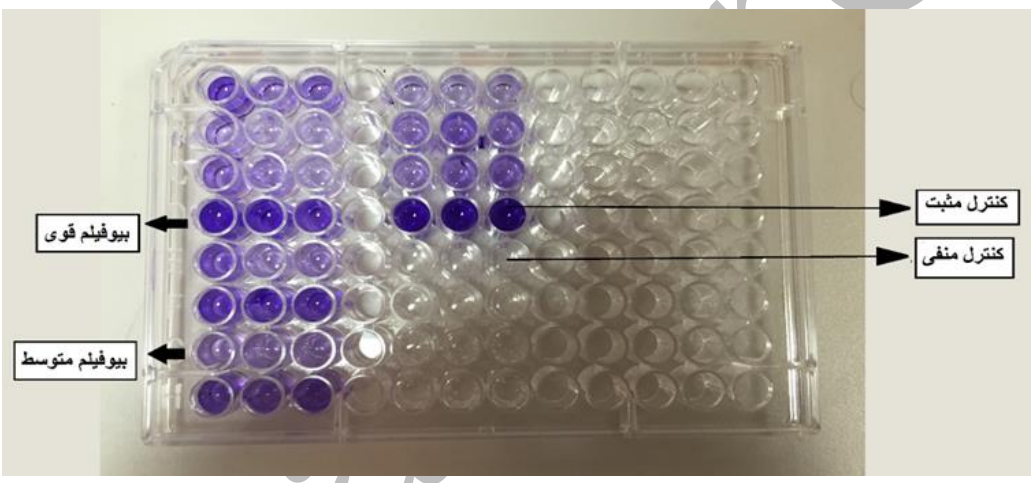
روش صفحه کشت بافت (**TCP**)

در بررسی تشکیل بیوفیلم به روش TCP که روش استاندارد است پس از قرائت نتایج و تعیین ODc (جدول ۱)، ۴۰ نمونه تشکیل بیوفیلم قوی و ۲۲ نمونه تشکیل بیوفیلم متوسط، ۲۸ نمونه تشکیل بیوفیلم ضعیف و ۱۰ نمونه فاقد تشکیل بیوفیلم بودند. در این روش نمونه فاقد قدرت تولید بیوفیلم شناسایی نشد. میزان بیوفیلم جدایه ها در شکل ۱ بر همین اساس تعیین‌شده است.

جدول ۱: تفسیر نتایج تشکیل بیوفیلم سویه‌های *اشریشیا کلی یوروپاتوژن* با روش TCP

توانایی تشکیل بیوفیلم	نتایج مقادیر میانگین OD	محاسبه میزان ODc
قوی	۰/۹۲۹< OD نمونه	OD > ۴× ODc نمونه
متوسط	۰/۴۶۴< OD نمونه ≤ ۰/۹۲۹	۲×ODc< OD نمونه ≤ ۴× ODc
ضعیف	۰/۲۳۲< OD نمونه ≤۰/۴۶۴	ODc< OD نمونه ≤۲×ODc
منفی	OD نمونه ≤۰/۲۳۲	OD نمونه ≤ODc

(Sd) انحراف معیار=۰/۰۳۲۱۴
(mean) میانگین =۰/۱۳۶
ODc=۰/۲۳۲



شکل ۱. تشکیل بیوفیلم *اشریشیا کلی یوروپاتوژن* به روش TCP

نتایج روش کنگو ر آگار (**CRA**)

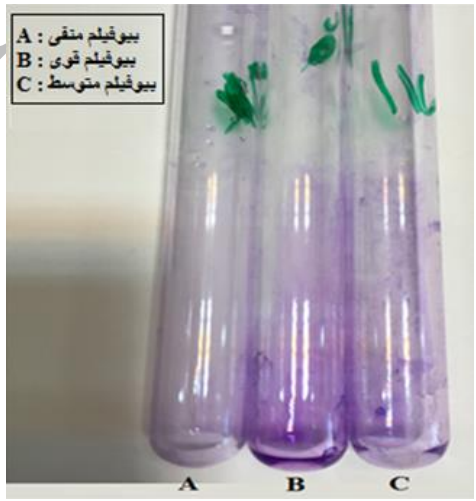
نتایج مربوط به جدایه های *اشریشیاکلی* یوروپاتوژن تشکیل‌دهنده اسلایم یا بیوفیلم با روش CRA بر اساس شکل ظاهری کلنی‌ها تفسیر شدند. کلنی‌های سیاه‌رنگ با ظاهر و قوام خشک و سطح و لبه‌های خشن به‌عنوان تولیدکننده‌های قوی اسلایم در نظر گرفته شدند. کلنی‌های سیاه‌رنگ با سطح صاف و گرد و براق و هم‌چنین کلنی‌های قرمزرنگ با ظاهر خشک و سطح و لبه‌های خشن به‌عنوان تولیدکننده متوسط اسلایم در نظر گرفته شدند. کلنی‌های قرمزرنگ با سطح صاف و براق ازنظر تولید اسلایم منفی در نظر گرفته شدند. بر اساس خصوصیات کلنی‌های تشکیل‌شده (شکل ۲)، ۴ جدایه تشکیل بیوفیلم قوی، ۶۵ جدایه تشکیل بیوفیلم ضعیف و ۳۱ جدایه فاقد قدرت تشکیل بیوفیلم بودند.

Final proof

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

نتایج روش کدورت در لوله (TM)

درروش TM (شکل ۳)، ۲۳ جدایه تشکیل بیوفیلم قوی و ۵۹ جدایه تشکیل بیوفیلم ضعیف دادند و ۱۸ جدایه ازنظر تشکیل بیوفیلم منفی بودند.



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

نتایج تعیین حساسیت و ویژگی روش‌های کنگورد آگار و کدورت در لوله

با توجه به اینکه روش TCP روش استاندارد طلایی برای تشخیص بیوفیلم محسوب می‌شود، تعیین آزمون حساسیت و ویژگی برای روش‌های کنگورد آگار و کدورت لوله مشخص گردید. ویژگی و حساسیت روش CRA به ترتیب ۵۰/۹٪ و ۳۹/۱٪ گزارش شد. ویژگی و حساسیت برای روش TM به ترتیب ۷۹/۴۱٪ و ۲۸/۱۲۵ گزارش شد (جدول ۲).

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

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

بحث

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

Final Proof

در تحقیق حاضر روش TCP به‌عنوان یک روش استاندارد طلایی در تشخیص بیوفیلم مورداستفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که تمام جدایه های *اشریشیا کلی* ازنظر توانایی خود برای تولید بیوفیلم بر روی سطح پلیت میکروتیتر به چهار گروه قوی (۴۰٪)، متوسط (۲۲٪)، ضعیف (۲۸٪) و منفی (۱۰٪) تقسیم شدند.

Cucarella و همکاران در سال ۲۰۰۱، ۱۴ ایزوله *اشریشیاکلی* را ازنظر توانایی تولید بیوفیلم در شرایط آزمایشگاهی توسط TCP مورد ارزیابی قراردادند و به این نتیجه رسیدند که از ۱۴ سویه *اشریشیاکلی*، ۱۰ سویه ازنظر تشکیل بیوفیلم مثبت بودند (۲۰). Naves و همکاران در سال ۲۰۰۸، توانایی تشکیل بیوفیلم *اشریشیا کلی* به روش TCP را در محیط‌های لوریا برتانی، M63، M9، MHII موردبررسی قراردادند و مشاهده کردند که تشکیل بیوفیلم در محیط MHII وM9 بیشتر از تشکیل بیوفیلم در محیط‌های M63 و لوریا برتانی است. این مطالعه نشان داد که توانایی تشکیل بیوفیلم باکتری تحت تأثیر محیط کشت، ممکن است متفاوت باشد (۲۱). Samet و همکاران طی سال‌های ۲۰۱۰ و ۲۰۱۱، ۱۷۰ نمونه *اشرشیاکلی* بیمارستانی و غیر بیمارستانی جداشده از بیماران مبتلابه عفونت ادراری را جهت بررسی تشکیل بیوفیلم به روش TCP در محیط‌های LB و BHI برات با افزودن ساکاروز ۱٪ موردمطالعه قراردادند و به این نتیجه رسیدند که ۲۰ جدایه *UPEC* (۱۱/۳٪) در محیط LB و ۱۰۵ جدایه (۶۱/۸٪) در محیط BHI برات تشکیل بیوفیلم دادند (۲۲). این مطالعات نشان داد که نوع محیط کشت می‌تواند بر روی میزان تشکیل بیوفیلم باکتریایی تأثیر داشته باشد. Thilakavathy و همکاران در سال ۲۰۱۵، ۴۵۶ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* را جهت بررسی تشکیل بیوفیلم به روش‌های TM، CRA و TCP مورد ارزیابی قراردادند و مشاهده کردند که درصد تولید بیوفیلم در هنگام سنجش با روش TCP (۳۹،۵۷٪) بالاترین میزان بود. تشکیل بیوفیلم با روش‌های TM و CRA به ترتیب، ۳۰/۲٪ و ۱۷/۷٪ گزارش شد (۲۳). طی مطالعه‌ای که Mathur و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام دادند، تعداد تولیدکنندگان بیوفیلم با روش TCP بالا و ۵۳/۹٪ تشخیص داده شد و با روش‌های TM و CRA به ترتیب ۱۱/۸٪ و ۵/۱۷٪ جدایه ها تولیدکننده بیوفیلم بودند (۱۸). در سال ۲۰۰۷ Skyberg و همکاران تشکیل بیوفیلم *اشریشیاکلی* به روش TCP را در محیط‌های BHI و تریپتیکاز سوی برات موردبررسی قراردادند و مشاهده کردند که فقط ۲۹/۴٪ سویه‌های *اشریشیاکلی* توانایی تشکیل بیوفیلم قوی در محیط BHI رادارند و ۴۴/۷٪ جدایه‌های *اشریشیاکلی* در محیط تریپتیکاز سوی برات تشکیل بیوفیلم دادند (۲۴).

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

Ponnusamy و همکاران سال ۲۰۱۲، ۱۰۰ جدایه *اشریشیاکلی* یوروپاتوژن را ازنظر تشکیل بیوفیلم با روش‌های TCP، TM و CRA موردسنجش قراردادند. با روش TM، ۱۷/۲۳٪ بیوفیلم قوی، ۲۶/۳٪ بیوفیلم متوسط و ۵۰٪ بیوفیلم ضعیف بودند. با روش CRA جدایه های بیوفیلم مثبت به ۲۳/۲۳٪ قوی، ۳۷٪ متوسط و ۴۰٪ ضعیف تقسیم شدند در حالی که درروش TCP، ۶٪ جدایه ها بیوفیلم قوی، ۸۰٪ بیوفیلم متوسط و ۱۴٪ بیوفیلم ضعیف تشکیل دادند. در این تحقیق روش TM روش مناسب برای سنجش بیوفیلم *اشریشیا کلی* معرفی نشد (۲۵).

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

Final Proof

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

در این تحقیق برای مقایسه دو روش کیفی TM و CRA با روش کمی TCP به‌عنوان روش استاندارد طلایی جهت سنجش میزان تشکیل *بیوفیلم اشریشیاکلی* یوروپاتوژن، درصد ویژگی و حساسیت دو روش موردبررسی قرار گرفت. حساسیت روش CRA (۳۹/۱٪) در مقایسه با روش TM (۷۸/۳٪) بسیار کمتر بود. همچنین ویژگی روش CRA (۵۰/۹٪) و ویژگی روش TM (۷۹/۷٪) گزارش شد .در مطالعه Hassan و همکاران در سال ۲۰۱۱، ۱۵۰ نمونه کلینیکی (*استافیلوکوکس اورئوس، استافیلوکوکس اپیدرمیدیس، اشریشیاکلی و سودوموناس آئرژینوزا*) از بیماران بستری در بخش‌های مراقبت ویژه جهت بررسی تشکیل بیوفیلم توسط روش‌های TM، CRA و TCP موردبررسی قرار گرفت و مشاهده شد که روش TCP، یک روش قابل‌اعتماد و استاندارد طلایی برای تشخیص بیوفیلم است و حساسیت روش CRA (۱۱٪) در مقایسه با روش TM (۷۳٪) بسیار کم است (۳۰). در سال ۲۰۱۴ Saxena و همکاران دو روش TM و TCP اصلاح‌شده با اسید استیک گلاسیال و بدون اسید استیک را برای بررسی بیوفیلم جدایه های *سودوموناس آئرژینوزای* جداشده از عفونت مجاری تنفسی موردمطالعه قرار دادند. با روش TM ۲۰٪ جدایه ها بیوفیلم قوی، ۲۱/۲۵٪ متوسط و ۵۸/۷۵٪ بیوفیلم منفی بودند. با روش TCP اصلاح‌شده با اسید استیک گلاسیال ۲۳/۶٪ جدایه ها دارای بیوفیلم قوی و ۷۴/۴٪ بیوفیلم متوسط داشتند ولی با روش TCP بدون گلاسیال ۲۰٪ بیوفیلم قوی و ۸۰٪ بیوفیلم متوسط بودند. ویژگی و حساسیت روش TM، ۸۴/۳٪ و ۵۸/۶٪ و برای هر دو روش TCP اصلاح‌شده ۸۸/۶٪ و ۶۳/۹٪ بود (۳۱).

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

تقدیر و تشکر

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

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

Final Proof

References

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

Final Proof

25. Ponnusamy P, Natarajan V, Sevanan M. In vitro biofilm formation by uropathogenic Escherichia coli and their antimicrobial susceptibility pattern. Asian Pac JTrop Dis. 2012; 5(3):210-3.

26. Knobloch JK M, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in Staphylococcus aureus. Med Microbiol Immun. 2002; 191(2):101-6.

27. Růžička F, Hola V, Votava M, Tejkalova R, Horvát R, Heroldová M, et al. Biofilm detection and the clinical significance of Staphylococcus epidermidis isolates. Folia microbiologica. 2004; 49(5):596.

28. Oliveira A, Maria de Lourdes R. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. BMC Res Notes. 2010;3(1):260.

29. Deka N. Comparison of Tissue Culture plate method, Tube Method and Congo Red Agar Method for the detection of biofilm formation by Coagulase Negative Staphylococcus isolated from Non-clinical Isolates. Int J Curr Microbiol App Sci. 2014; 3(10):810-5.

30. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Braz J Infect Dis. 2011; 15(4):305-11.

31. Saxena S, Banerjee G, Garg R, Singh M. Comparative study of biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa isolates from patients of lower respiratory tract infection. J Clin Diagn Res. 2014;8(5): 911.

32. Panda PS, Chaudhary U, Dube SK. Comparison of four different methods for detection of biofilm formation by uropathogens. Indian J Pathol Microbiol. 2016;59(2):177.

Final Proof