مقاله پژوهشی

# بررسی تشکیل بیوفیلم در اشرشیاکلی ایزوله شده از نمونه‌های کلینیکی در شهرستان زاهدان

**نویسندگان:**

**سارا جلیلیان[1]، فرخ رخ بخش زمین[2]***

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.15, No.1, Spring 2017

**چکیده:**

**مقدمه:** اشرشیاکلی یک عامل مهم عفونت مجاری ادراری- تناسلی است. این باکتری به علت اکتساب پلاسمیدهایی کد کننده بتالاکتامازهای طیف گسترده، به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مقاوم شده است و از این رو یک مشکل بهداشتی مهم محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های اشرشیاکلی جداشده از نمونه‌های کلینیکی در شهرستان زاهدان است.

**روش کار:** تعداد ۶۰ ایزوله از سویه‌های اشرشیاکلی جداشده از بیماران مراجعه‌کننده به آزمایشگاه‌های شهر زاهدان جمع‌آوری شد. شناسایی جدایه‌ها با آزمون‌های بیوشیمیایی مورد تأیید قرار گرفت و سپس آزمایش PCR برای ردیابی ژن‌های بتا لاکتامازی CTX، TEM و SHV انجام شد. توانایی جدایه‌های اشرشیاکلی در تولید بیوفیلم با روش میکروتیتر پلیت و استفاده از الایزا بررسی شد.

**یافته‌ها:** در این بررسی، میزان فراوانی ژن‌های بتالاکتاماز به ترتیب برای CTX و TEM برابر با ۴۱ نمونه (۶۸/۳٪) و ۲۸ نمونه (۴۶/۶٪) بود، ولی در هیچ نمونه‌ای ژن SHV ردیابی نشد. مطالعه فنوتیپی جدایه‌ها بر اساس اندازه‌گیری جذب نوری نشان داد که تنها ۱۰ ایزوله توانایی تشکیل بیوفیلم قوی در میکروتیتر پلیت را در میان اشرشیاکلی‌های بالینی را داشتند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این پژوهش بیانگر لزوم تأکید روی مصرف دوز کافی آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌ها ناشی از بیوفیلم است، بنابراین تشخیص سریع جدایه‌های دارای توانایی تشکیل بیوفیلم برای اتخاذ تصمیم‌های درمانی و مدیریتی ضروری به نظر می‌رسد.

**واژگان کلیدی:** اشرشیاکلی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی،PCR ، بیوفیلم

Pars J Med Sci 2017;15(1):36-42

## مقدمه:

بیشترین گونه باسیل گرم منفی شایع در فلور مدفوعی، اشرشیاکلی است. این باکتری یک‌گونه متنوع است که توانایی کلونیزه شدن و پایداری در میزبان‌های حیوانی، انسانی و محیط را دارد. اشرشیاکلی باکتری گرم منفی و میله‌ای شکل است که معمولاً در روده موجودات خونگرم یافت شده، به‌عنوان بخشی از فلور طبیعی روده انسان طبیعتاً غیر بیماری‌زا است ولیکن برخی از سروتیپ‌های آن می‌توانند باعث مسمومیت غذایی جدی در انسان شوند [۱].

عفونت مجاری ادراری ناشی از این باکتری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی و دومین عفونت شایع و از علل عمده مراجعه بیماران به بیمارستان‌ها است در میان همه عوامل باکتریال یوروپاتوژن در بیماران سرپایی و بستری، اشرشیاکلی، باسیل گرم منفی و فلور نرمال روده، شایع‌ترین عامل است که بین ۷۵ تا ۹۰ درصد در موارد عفونت ادراری جداشده است [۲].

شناخت الگوی حساسیت آن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف اهمیت دارد. میزان حساسیت باکتری‌های جداشده به آنتی‌بیوتیک‌ها در مناطق مختلف متفاوت است. اختلاف در الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در مناطق مختلف دنیا می‌تواند نتیجه اختلاف در میزان و نوع مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در هر منطقه باشد [۳] ؛ بنابراین استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در هر منطقه باید بر اساس الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن منطقه باشد زیرا هم‌اکنون۵۰-۲۰ درصد از سویه‌های اشرشیاکلی حتی در کشورهای توسعه‌یافته به آنتی‌بیوتیک‌های خط اول درمان مقاوم شده‌اند[۴].

نویسنده مسئول، نشانی: گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

تلفن تماس: ۳۱۳۲۱۳۱۸(۳۴)- ۳۳۲۱۰۰۵۱(۳۴) پست الکترونیک: rokhbakhsh@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۵/۲/۲ اصلاح: ۱۳۹۶/۴/۱۱ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۱۳

آنزیم‌های بتالاکتامازی مهم‌ترین عامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام در میان باکتری‌های گرم منفی است. ژن‌های بتالاکتامازی در باکتری به‌ویژه ژن‌های ESBLs یکی از عوامل مؤثر در افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام ازجمله سفالوسپورین‌های طیف گسترده است. ارگانیسم‌هایی که این ژن‌ها را در خود حمل می‌کنند باعث افزایش بیماری‌زایی و مرگ‌ومیر در بین افراد می‌شوند [۵]. شناسایی جدایه‌های اشرشیاکلی بیماری‌زا نیازمند جداسازی این ارگانیسم‌ها از جدایه‌های غیرپاتوژنیک (فلور طبیعی روده) است که این مورد توسط تشخیص مولکولی به‌خصوص روش PCR انجام می‌شود [۶].

در طبیعت، باکتری‌ها به دو شکل پلانکتونیک و بیوفیلم یافت می‌شوند. بیوفیلم باکتریایی، تجمعات پیچیده باکتری‌ها هستند که در یک پوشش گلیکوکالیکس محصورشده و به سطوح مخاطی می‌چسبند. بیوفیلم‌ها مجموعه‌ای از سلول‌های میکروبی هستند که به‌طور برگشت‌ناپذیر به سطح وابسته‌اند و به‌وسیله شستشو ملایم از بین نمی‌روند. علاوه بر این، تمایز سلول‌های غیر متصل (Planctonic) به شکل بیوفیلم بالغ، تغییرات فنوتیپی را ایجاد می‌کند که دارای پیامدهای عمده‌ای از قبیل افزایش مقاومت به عوامل ضدمیکروبی و از بین نرفتن توسط دفاع میزبان است. بیش از ۵۰٪ عفونت‌های باکتریایی گزارش‌شده شامل تشکیل بیوفیلم-اند [۷]. تشکیل بیوفیلم در گونه‌های مختلف باکتری‌ها ازجمله اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا مشاهده‌شده است مهم‌ترین خاصیت متمایز بیوفیلم‌ها تفاوت در رشد آن‌ها است که سبب مقاومت داروئی و نیاز به درمان متفاوت و روش‌های متمایز شناسایی بیوفیلم‌ها می‌شود [۸].

هدف از پژوهش حاضر، تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم توسط نژادهای اشرشیاکلی ایزوله شده از نمونه‌های کلینیکی در شهرستان زاهدان در سال ۱۳۹۴ است.

## روش کار:

### بیماران و جمع‌آوری نمونه:

در این تحقیق تعداد ۶۰ جدایه از نمونه‌های مدفوعی بیماران با علائم اسهال و مشکوک به عفونت اشرشیاکلی از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهر زاهدان جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در ظرف استریل و درپوش دار مخصوص در شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل شدند. در آزمایشگاه برای آماده‌سازی نمونه‌ها، نمونه‌های مدفوعی با محلول فسفات بافرسالین یکنواخت شد. سپس ذرات جامد و مواد خشبی موجود در مدفوع، با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه رسوب داده و مایع فوقانی در ظرف استریل دیگری در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

### شناسایی فنوتیپی میکروبی:

نمونه‌ها روی مک کانگی آگار، گزیلوز لیزین دزوکسی کولات (XLD)، سالمونلا شیگلا آگار (SSA) تیوسولفات سیترات نمک صفرا سوکروز (TCBS) کشت داده و در ۳۷ درجه بعد از ۲۴ ساعت برای جداسازی اشرشیاکلی انکوبه شدند. کلنی‌های قرمزرنگ روی مک کانگی تحت عنوان اشرشیا کلی شناسایی شد. پس از یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه، پرگنه‌های مشکوک به اشرشیا کلی را بر روی محیط آگاروز در صورت منفی بودن جهت تأیید نهایی روی محیط‌های بیو شیمیایی نظیر TSI، سیمون سیترات، MR-VP و محیط SIM انتقال داده شد.

### آزمون PCR:

تعداد ۶۰ نمونه برای استخراج DNA و انجام PCR آماده شدند. برای استخراج DNA از کیت شرکت مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران استفاده شد. به‌منظور ردیابی ژن‌های بتالاکتامازی CTX، TEM و SHV از پرایمرهای اختصاصی طبق مطالعات گذشته استفاده شد [۹-۱۱]. واکنش PCR طبق جدول ۱ انجام شد. برنامه دمایی واکنش PCR به شرح زیر بود: یک سیکل ۹۵ درجه ۱۵ ثانیه، ۳۵ سیکل ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۱ دقیقه، ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه. سپس نتایج روی ژل ۱٪ آگارز الکتروفورز بررسی شد.

جدول ۱ : مقادیر موردنیاز برای انجام واکنش PCR

| نوع ماده | میزان | غلظت |
|---|---|---|
| PCR buffer | 2/5 µl | (10X) |
| MgCl2 | 2 µl | 25mM |
| dNTPs | 1 µl | 2mM |
| Taq polymerase | 1 µl | 5U/µl |
| Primer F*۳ | 1/5 µl | 20 p.mol |
| Primer R*۳ | 1/5 µl | 20 p.mol |
| DNA | 2 µl | |
| Distilled water | 8µl | |
| Total | 25 µl | |

**سنجش تشکیل بیوفیلم:**

جهت بررسی توانائی جدایه های اشرشیا کلی در تولید بیوفیلم، آزمون تشکیل بیوفیلم در محیط آزمایشگاه طبق روش زیر انجام گردید. جدایه‌ها پس از کشت TSB یک شبانه‌روزی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، انکوبه شدند. سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند از هرکدام از ایزوله‌ها تهیه گردید و تمام چاهک‌ها در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای با ۲۰۰ میکرو لیتر از محیط پر گردیدند. سپس به هر یک از چاهک‌ها ۲۰۰ میکرو لیتر از استوک آنتی‌بیوتیکی هر یک از دو آنتی‌بیوتیک در حداکثر غلظت (پنی‌سیلین ۳۲ml/gو سیپرو فلوکساسین ۶۴ml/g) اضافه شد و رقت سازی به‌صورت سریالی انجام گردید. سطح پلیت‌ها پوشیده شد و به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. بعد از تخلیه محتویات چاهک‌ها، سه بار شستشو با PBS انجام شد. پس از ۱۵ دقیقه الکل خارج و پلیت در هوا خشک گردید. تمام خانه‌ها ۱۰۰ میکرو لیتر کریستال ویوله ۲٪ اضافه و پس از ۲۰ دقیقه پیت‌ها در زیر شیر آب شستشو تا رنگ اضافی از چاهک‌ها خارج شود. سپس اسید استیک ۳۳٪ حدود ۱۵۰ میکرو لیتر به پلیت‌ها جهت آزاد شدن رنگ اضافه شد و جذب نوری (OD) هر یک از خانه‌ها در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از الایزا ریدر خوانش شد. همچنین از آنتی‌بیوتیک بدون سوسپانسیون و کنترل مثبت (ATCC-25923) به‌عنوان کنترل منفی و مثبت به ترتیب استفاده شد. توانایی تشکیل جذب نوری در ۴ ساعت ثبت شد. در انتها میزان کاهش بیوفیلم ناشی از آنتی‌بیوتیک‌ها را می‌توان از طریق جذب نوری چاهک تیمار شده، شاهد، کنترل طبق فرمول زیر به دست آورد.

درصد کاهش = 100 × [(C-B)-(T-B)]

C= میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل

B= میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد

T= میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار شده

در مطالعه حاضر کلیه ملاحظات اخلاقی در مورد تمامی نمونه ها و اطلاعات بالینی و سایر موارد پژوهشی رعایت گردید.

## یافته‌ها:

در این تحقیق ۶۰ جدایه از نمونه‌های مدفوعی بیماران با علائم اسهال و مشکوک به عفونت اشرشیاکلی، پس از انجام کشت و با آزمون‌های بیوشیمیایی تأیید شدند. با روش PCR از ۶۰ نمونه جمع‌آوری‌شده، ۴۱ نمونه دارای ژن بتالاکتاماز CTX (۶۸/۳٪) و ۲۸ نمونه دارای ژن بتالاکتاماز TEM(۴۶/۶٪) بودند و ژن بتالاکتاماز SHV در هیچ نمونه‌ای مثبت نشد.

از مجموع نمونه‌های مواجهه شده با غلظت MIC ۰/۶۳µg/µl آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، تعداد ۱۰ نمونه بیوفیلم قوی و تعداد ۶ سویه متوسط و تعداد ۴ سویه ضعیف به دست آمد (جدول ۲). از مجموع نمونه‌های مواجهه شده با غلظت MIC ۱/۹µg/µl آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین، تعداد ۳ نمونه بیوفیلم قوی و تعداد ۶ سویه متوسط و تعداد ۱۱ سویه ضعیف حاصل شد (جدول ۳).

جدول ۲: نتایج حاصل از تأثیر آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین بر میزان جذب نوری بیوفیلم اشرشیاکلی‌های جداشده

| منبع | جنس و گونه | تعداد | پنی‌سیلین میانگین MIC (µg/mg) بیوفیلم ۰/۲۵≤حساس نیمه حساس ۰/۲۵ ۰/۵ ≤ مقاوم | تشکیل بیوفیلم در میکرو تیتر پلیت | | | | میانگین جذب نوری |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | منفی | ضعیف | متوسط | قوی | |
| نمونه‌های بالیتی | اشرشیا کلی | ۲۰ | ۰/۶۳ | – | ۴ | ۶ | ۱۰ | ۰/۳۲ |
| ATCC 25923 | اشرشیا کلی شاهد مثبت بدون تأثیر آنتی‌بیوتیک | ۱ | – | – | – | – | ۱ | ۰/۲۹ |

جدول ۳: نتایج حاصل از تأثیر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بر میزان جذب نوری بیوفیلم اشرشیاکلی‌های جداشده

| منبع | جنس و گونه | تعداد | سیپروفلو کساسین میانگین MIC (µg/mg) بیوفیلم ۱ ≤ حساس نیمه حساس ۲ ۴ ≤ مقاوم | تشکیل بیوفیلم در میکرو تیتر پلیت | | | | میانگین جذب نوری |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | منفی | ضعیف | متوسط | قوی | |
| نمونه‌های بالینی | اشرشیا کلی | ۲۰ | ۱/۹ | – | ۱۱ | ۶ | ۳ | ۰/۲۶ |
| ATCC25923 | اشرشیا کلی شاهد مثبت بدون تأثیر آنتی‌بیوتیک | ۱ | – | – | – | – | ۱ | ۰/۲۹ |

## بحث:

تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی ناشی از ژن‌های بتالاکتاماز و تشکیل بیوفیلم توسط نژادهای اشرشیاکلی که علاوه بر بیماری‌های روده‌ای، طیف وسیعی از عفونت‌های خارج روده‌ای در انسان و حیوانات به‌وسیله سویه‌های اشرشیاکلی خارج روده‌ای ایجاد می‌کند، بسیار اهمیت دارد. ژن‌های بتالاکتامازی در باکتری به‌ویژه ژن‌های ESBLs یکی از عوامل مؤثر در افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام ازجمله سفالوسپورین‌های طیف گسترده است. از این رو تمامی عوامل درگیر در ایجاد و تغییر الگوی آنتی‌بیوتیکی هر منطقه اهمیت بهداشتی را ایجاد می‌کند که نیاز به پایش مداوم با روش‌های دقیق دارد.

در مطالعه حاضر ۴۱ نمونه (۶۸/۳٪) دارای ژن بتالاکتاماز CTX و ۲۸ نمونه (۴۶/۶٪) دارای ژن بتالاکتاماز TEM بودند و ژن بتالاکتاماز SHV در هیچ نمونه مثبت نشد. این نتیجه بامطالعه فانگ در سوئد مبنی بر میزان فراوانی ژن‌های ESBL در اشرشیاکلی جداشده از بیمارستان‌ها طی ۵ سال تفاوت‌هایی دارد. در مطالعه فانگ، میزان فراوانی ژن‌های TEM و CTX به ترتیب ۶۳٪ و ۹۲٪ به دست آمد که این میزان فراوانی بیشتر از مطالعه حاضر است که دلیل آن، مدت‌زمان مطالعه است که مطالعه حاضر در طی یک سال انجام‌شده است [۱۲]. در مطالعه‌ای توسط هوری و همکاران در استان ایلام، جدایه‌ها ازنظر وجود ژن‌های بتالاکتاماز (blaTEM و blaSHV) با روش RAPD-PCR بررسی شدند. بیست جدایه (۶۴/۵٪) و ۶ جدایه (۱۹/۳٪) واجد ژن blaTEM و blaSHV بودند که میزان فراوانی از مطالعه حاضر بیشتر است. در بین جدایه‌ها کمترین میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین گزارش شد [۱۳]. در مطالعه‌ای توسط فیض‌آبادی در تهران، میزان فراوانی ژن‌های blaSHV و TEM در جدایه های ESBL دارای MIC=16 به سفتازیدین به ترتیب ۲۲٪ و ۹٪ گزارش‌شده است که این میزان در مطالعه حاضر بیشتر است [۱۴]. مطالعه ناظمی در تهران، میزان فراوانی ژن‌های CTX، TEM و blaSHV به ترتیب ۸۷/۱٪، ۶۸/۸٪ و ۷۰/۶٪ را نشان داد که بامطالعه فیض‌آبادی و مطالعه حاضر متفاوت است [۱۵]. همچنین در مطالعه‌ای توسط ولدبیگی در ایلام نشان داده‌شده است که میزان فراوانی ژن TEM ۵۲/۵٪ و تقریباً مشابه بامطالعه حاضر و متفاوت از مطالعه هوری در این شهرستان است [۱۶]. در مطالعه‌ای در کرمان میزان فراوانی ژن‌های blaTEM و blaSHV به ترتیب ۲/۴٪ و ۵/۵٪ بود که توزیع فراوانی آن بسیار پائین تر از جدایه های اشرشیاکلی مطالعه حاضر است [۱۷]. در مطالعه دیگری در شیراز میزان فراوانی ژن‌های TEM و SHV و CTX-M به ترتیب ۸۳/۳٪ و ۲۰/۴٪ و ۳۱/۵٪ بود که توزیع فراوانی ژن TEM و SHV بالاتر از جدایه های اشرشیاکلی مطالعه حاضر است [۱۸]. در مطالعه‌ای در تهران، میزان فراوانی ژن‌های TEM و SHV به ترتیب ۶۰٪ و ۲۴٪ بود که توزیع فراوانی ژن SHV بسیار بالاتر از جدایه های اشرشیاکلی مطالعه حاضر است [۱۹]. در مطالعه دیگری در تایلند میزان این ژن‌ها فراوانی بالایی داشت که در خصوص ژن SHV بامطالعه حاضر همخوانی ندارد [۲۰]. در مطالعه‌ای در اصفهان نیز میزان فراوانی ژن‌های CTX، TEM و blaSHV به ترتیب ۳۷/۹٪، ۷۲/۴٪ و ۱۱/۹٪ نشان داد که میزان فراوانی ژن blaSHV و TEM بالاتر از مطالعه حاضر است [۲۱].

در مطالعه‌ای توسط امام قریشی در جهرم، میزان MIC سیپروفلوکساسین ۰/۸۴ در مقابل مقدار (۰/۲۶) مربوط به مطالعه حاضر گزارش‌شده است [۲۲]. در مطالعه‌ای طوسی و همکاران به بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم در استافیلوکوک اورئوس در تهران پرداختند. تمامی جدایه‌ها ازنظر حضور ژن‌های icaA و icaD با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد ارزیابی قرار گرفتند که ۸۷/۷٪ جدایه‌ها دارای ژن‌های icaA و icaD بودند. همچنین بررسی فنوتیپی تشکیل بیوفیلم با استفاده از میکروپلیت‌های تیتراسیون نشان داد که به ترتیب ۴/۴٪، ۴۰٪ و ۴۳/۳٪ از

جدایه‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم به‌صورت قوی، متوسط و یا ضعیف می‌باشند و تنها ۱۲/۲٪ جدایه‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم در محیط آزمایشگاه نبودند. نتایج این مطالعه شیوع بالایی از ژن‌های ایجادکننده بیوفیلم و بیان فنوتیپی نسبتاً بالایی از ژن‌های ایجادکننده بیوفیلم و بیان فنوتیپی نسبتاً بالایی را نشان می‌دهد [۲۳].

در مطالعه حاضر، میزان تشکیل بیوفیلم در مواجه با پنی‌سیلین، در غلظت MIC پایین‌تری نسبت به سیپروفلوکساسین انجام شد و نتایج نشان داد که مقاومت به سیپروفلوکساسین هنوز کمتر از پنی‌سیلین در ایزوله‌های دارای ژن ESBL وجود دارد و این نشان‌دهنده مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین در عفونت‌های ادراری است. این نتیجه با مطالعات قبلی مشابهت دارد که نشان می‌دهند میزان تشکیل بیوفیلم در حضور پنی‌سیلین بیشتر از سیپروفلوکساسین است [۲۴]. از طرفی دیگر نتایج مطالعه بیانگر این است که اغلب نمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین مقاوم بوده و پنی‌سیلین توانایی حذف بیوفیلم را در مقابل آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین نداشته است. به همین دلیل بیوفیلم قوی‌تری در ارتباط با آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین ایجاد می‌شود.

## نتیجه‌گیری:

نتایج حاصل از پژوهش نشان داد میزان فراوانی ژن‌های ESBL ازجمله CTX و TEM در این منطقه جغرافیایی بالا است. از طرفی دیگر نتایج تأکید می‌کند که مصرف دوز کافی آنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله پنی‌سیلین و سیپروفلوکساسین در درمان عفونت‌های ادراری باید موردتوجه قرار گیرد. با توجه به این‌که توانایی تشکیل بیوفیلم نقش مهمی در ویرولانس این باکتری دارد، ایجاد مقاومت بیشتر به این آنتی‌بیوتیک از طریق ژن‌های ESBL باید موردتوجه قرارگرفته و تشخیص سریع جدایه‌های دارای توانایی تشکیل بیوفیلم برای اتخاذ تصمیمات درمانی و مدیریتی ضروری به نظر می‌رسد.

## تشکر و قدردانی:

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر خود را از مسئولین و کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی اعلام می‌دارند. این مقاله حاصل قسمتی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه آزاد کرمان است که بودجه آن از محل طرح‌های تحقیقاتی تأمین‌شده است.

## تعارض منافع:

نویسندگان مقاله حاضر هیچ‌گونه تعارض منافع با توجه به تألیف و یا انتشار اعلام نکرده‌اند.

## References:

1. Levine MM. Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J Infec Dis 1987;155(3):377-89.
2. Agarwal J, Srivastava S, Singh M. Pathogenomics of uropathogenic Escherichia coli. Indian J Med Microbiol 2012;30(2):141۰.
3. Mandal J, Acharya NS, Buddhapriya D, et al. Antibiotic resistance pattern among common bacterial uropathogens with a special reference to ciprofloxacin resistant Escherichia coli. Indian J Med Res 2012;136(5):842.
4. Oliveira F, Paludo K, Arend L, et al. Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic Escherichia coli strains. Genet Mol Res 2011;10(4):4114-25.
5. Piatti G, Mannini A, Balistreri M, Schito AM. Virulence factors in urinary Escherichia coli strains: phylogenetic background and quinolone and fluoroquinolone resistance. J Clin Microbiol 2008;46(2):480-7.
6. Ciesielczuk H, Hornsey M, Choi V, et al. Development and evaluation of a multiplex PCR for eight plasmid-mediated quinolone-resistance determinants. J Med Microbiol 2013;62(12):1823-7.
7. Cegelski L, Pinkner JS, Hammer ND, et al. Small-molecule inhibitors target Escherichia coli amyloid biogenesis and biofilm formation. Nat Chembiol 2009;5(12):913-9.
8. Yang L, Barken KB, Skindersoe ME, et al. Effects of iron on DNA release and biofilm development by Pseudomonas aeruginosa. Microbiol 2007;153(5):1318-28.
9. Olson AB, Silverman M, Boyd DA, et al. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum β-lactamases from Kluyvera georgiana isolated in Guyana. Antimicrob Agents Chemother 2005;49(5):2112-5.
10. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, et al. Extended-spectrum β-lactamases in Klebsiella pneumoniae bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV-and CTX-M-type β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2003;47(11):3554-60.
11. Ghasemi Y, Archin T, Kargar M, et al. A simple multiplex PCR for assessing prevalence of extended-spectrum β-lactamases producing Klebsiella pneumoniae in Intensive Care Units of a referral hospital in Shiraz, Iran. Asian Pac J Trop Med 2013;6(9):703-8.

12. Fang H, Ataker F, Hedin G, et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum β-lactamases among Escherichia coli isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. J Clin Microbiol 2008;46(2):707-12.
13. Kazemian H, Heidari H, Ghanavati R, Mohebi R, Ghafourian S, Shavalipour A, et al. Characterization of Antimicrobial Resistance Pattern and Molecular Analysis among Extended Spectrum β-Lactamase-Producing Escherichia coli. Pharm Sci 2016;22(4):279-84.
14. Shahcheraghi F, Nikbin V-S, Feizabadi MM. Prevalence of ESBLs genes among multidrug-resistant isolates of Pseudomonas aeruginosa isolated from patients in Tehran. Microb Drug Resist 2009;15(1):37-9.
15. Yazd M, Nazemi A, Mir inargasi M, et al. Prevalence of SHV/CTX-M/TEM (ESBL) Beta-lactamase Resistance Genes in Escherichia Coli Isolated from Urinary Tract Infections in Tehran, Iran. Med Lab J 2010;4(1):0-0.
16. Valadbeigi T and Chalabzardi M. Evaluation Frequency of TEM, VEB and Per Gens Extended Spectrum Beta Lactamase Producing of Escherichia coli Strains Isolated from Urinary Tract Infections in Ilam City. J Ilam Univ Med Sci 2016; 24(1): 55-63.
17. Koshesh M, Mansouri S, Hashemizadeh Z, Kalantar-Neyestanaki D. Identification of extended-spectrum β-lactamase genes and ampc-β-lactamase in clinical isolates of escherichia coli recovered from patients with urinary tract infections in Kerman, Iran. Arch Ped Infect Dis 2016; 5(2): e37968
18. Ghorbani-Dalini S, Kargar M, Doosti A, et al. Molecular Epidemiology of ESBL Genes and Multi-Drug Resistance in Diarrheagenic Escherichia coli strains Isolated from Adults in Iran. Iran J pharm Res 2015; 14(4): 1257–1262.
19. Hosseini-Mazinani SM, Eftekhar F, Milani M, et al. Characterization of β-Lactamases from Urinary Isolates of Escherichia coli in Tehran. Iran Biomed J 2007;11(2):95-9.
20. Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, et al . Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. Antimicrob Agents Chemother 2008;52(8):2818-24.
21. Karimian M, Rostamzad A, Shoaei P. Extended spectrum β-lactamase-producing strains of Escherichia coli in hospitalized children in Isfahan, Iran. Avicenna J Clin Microbiol Infect 2015; 2(3): e27096.
22. Emamghoreishi F and Kohanteb J. Resistance patterns of Escherichia coli causing urinary tract infection. J Jahrom Univ Med Sci 2007; 5(1): 1-9.
23. Khorramian B, maneini M, Bolourchi M, et al. Evaluation of the biofilm-forming ability of Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis in Iran. Iran J Comp Biopathol 2010; 6(4):109-114.
24. May T, Ito A, Okabe S. Induction of multidrug resistance mechanism in Escherichia coli biofilms by interplay between tetracycline and ampicillin resistance genes. Antimicrob agents chemother 2009;53(11):4628-39.

Original Article

# Evaluating the ability of Biofilm formation in Escherichia coli isolated from clinical samples in Zahedan

**Sara Jalilian[1], Farokh Rokhbakhsh Zamin[2*]**

Received: 2017/22/04 Revised: 2017/2/07 Accepted: 2017/4/07

1. Dept of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.15, No.1, Spring 2017

Pars J Med Sci 2017;15(1):36-42


## Abstract:

**Introduction:**
Escherichia coli (E.coli) is the main causative pathogen in urinary tract [illegible] resistance based on Extended Spectrum -Lactamase (ESBL) producing Escherichia coli strains is reported to be the cause of community and hospital acquired infections therefore this this is an important problem in public health. The aim of this study was to identify the blaTEM, blaSHV and CTX genes in clinical isolates of E. coli recovered from patients with UTIs in Zahedan, Iran.

**Methods and Materials:**
Escherichia coli isolates (N=60) were analyzed by biochemistry and phenotypic methods. Each of the initial E. coli screening test isolate was investigated for the presence of blaTEM, blaSHV and blaCTX-M genes via polymerase chain reaction (PCR) using gene-specific primers.

**Results:**
Sixty tested isolates; the prevalence of blaTEM and blaCTX-M genes was determined to be 68.3%, 46.6% but blaSHV gene was not detected. Based on phenotypic tests, biofilm capacity was detected in 10 clinical isolates.

**Conclusions:**
The results of this study show that the use of adequate doses of antibiotics in the treatment of infections may be caused by biofilms are emphasized. Rapid detection of biofilm formation, therefore isolates have the ability to decide care and management is necessary.


**Keywords:** Escherichia Coli, Antibiotic Resistance, PCR, Biofilm

* Corresponding author Email: rokhbakhsh@gmail.com