مقاله پژوهشی

تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* یوروپاتوژن زنان باردار در شهر کرمان

نویسندگان:

سیما پویان[1]، نادیا کاظمی پور[1]*، فرخ رخ بخش زمین[1]

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

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.17, No.1, Spring 2019

چکیده:

مقدمه: عفونت های باکتریایی مجاری ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در دوران بارداری محسوب می شوند. اکثر باکتری‌های مزبور مولد بیوفیلم و مقاوم به ترکیبات ضد میکروبی هستند. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و میزان تشکیل بیوفیلم توسط ایزوله های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه حاصل از نمونه های ادراری زنان باردار در کرمان بود.

روش کار: نمونه ادرار ۱۰۷ زن باردار بررسی شد. ایزوله‌ها با آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی و برای تعیین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به روش انتشار دیسک و حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد ارزیابی شدند. هیدروفوبیسیتی سطح سلول و توانایی تشکیل بیوفیلم بر سطوح شیشه و پروپیلن در شرایط سکون و حرکت تعیین شدند. قابلیت اثرآنتی بیوتیک‌ها بر میزان تشکیل بیوفیلم بر سطح کاتتر ادراری مشخص شد.

یافته‌ها: از ۸۰ نمونه مثبت، ۳۵ ایزوله اشریشیا کلی و ۱۵ ایزوله کلبسیلا پنومونی‌ها انتخاب شدند. بیشترین مقاومت و حساسیت به ترتیب نسبت به آموکسی‌سیلین و ایمی‌پنم تعیین شد. موارد با هیدروفوبیسیتی بیشتر از ۷۰٪ قابلیت بهتری در تشکیل بیوفیلم به خصوص بر سطح پروپیلن در حالت متحرک نشان دادند. کشت با رقت های MIC×۰/۲۵ و ۰/۵ از آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی، توانایی چسبندگی ایزوله ها بر سطح کاتترهای ادراری را کاهش داد.

نتیجه‌گیری: باید پژوهش های مشابه به طور مداوم در مراکز پزشکی مختلف در راستای ارزیابی حساسیت ضدمیکروبی و تعیین میزان بیوفیلم صورت پذیرد تا بر اساس نتایج، راه کارهای مناسب تر درمانی برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم انتخاب و بهترین عملکرد درمانی در ارتباط با مبتلایان به عفونت‌های ادراری افراد باردار ارایه شود.

واژگان کلیدی: عفونت ادراری زنان باردار، اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بیوفیلم

Pars J Med Sci 2019;17(1):15-24

مقدمه:

عفونت مجاری ادراری پس از عفونت سیستم تنفسی از شایع ترین عفونت‌های باکتریایی در انسان بوده و به دو صورت اکتسابی جامعه و اکتسابی بیمارستان رخ می‌دهد [۱]. این عفونت همچنین یکی از شایع ترین عوارض پزشکی بارداری به حساب می‌آید که می‌تواند هم به شکل علامت‌دار و هم بدون علامت باشد. آمنیونیت، اندومتریت، پیلونفریت، کم وزنی هنگام تولد نوزاد، نارس بودن هنگام تولد، مرگ و میردوران جنینی (مرده زائی)، باکتریمی و سپتی سمی را به باکتریوری دوران بارداری نسبت می‌دهند[۲،۳،۴]. عوامل میکروبی بسیاری به عنوان عامل عفونت‌های ادراری شناخته شده‌اند که از جمله مهم ترین موارد می‌توان به *اشریشیاکلی* و*کلبسیلا پنومونیه* اشاره کرد که در جوامع مختلف *اشریشیاکلی* بیش از ۸۰ ٪ موارد عفونت‌های حاد دستگاه ادراری را شامل می شود [۵، ۶].

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

تلفن تماس: ۳۱۳۲۱۳۳۴(۰۳۴) پست الکترونیک: nadia_kazemi@yahoo.com

دریافت : ۱۳۹۷/۱۲/۸ اصلاح: ۱۳۹۸/۰۱/۲۸ پذیرش:۱۳۹۸/۳/۴

توانایی یوروپاتوژن‌ها برای متصل شدن به بافت‌های میزبان، یکی از فاکتورهای برتری است که کلونیزاسیون آن ها را در دستگاه ادراری تسهیل می‌کند. چندین فاکتور سطحی مانند تاژک، پیلی یا فیمبریه، اگزوپلی ساکاریدها و پیلی جنسی، در تشکیل بیوفیلم دخیل هستند[۷و۸و۹]. سهولت ابتلا به عفونت سیستم ادراری و عوارض بسیار خطرناک آن ازقبیل نارسایی کلیه، عفونت خون و زایمان زودرس، اهمیت تشخیص و درمان این بیماری را مشخص می‌کند. درمان صحیح، به موقع و کافی با آنتی بیوتیک مناسب گام مهمی در بهبود بیماری‌های عفونی است. پیدایش مقاومت در باکتری‌های پاتوژن نسبت به آنتی بیوتیک‌ها یکی از مشکلات درمانی در سراسر دنیا است. از طرف دیگر گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی تقریباً همیشه با افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها همراه است[۱۰،۱۱]. ظهور و گسترش سویه‌های مقاوم باکتریایی اغلب به دلیل ویژگی‌های ژنتیکی باکتری‌ها، افزایش جمعیت، جا به جایی، سفر و همچنین مصرف زیاد آنتی بیوتیک‌ها است. باتوجه به شیوع زیاد عفونت‌های ادراری و افزایش مقاومت میکروبی، تشخیص دقیق عامل بیماری و سازوکارهای مقاومت آن ها به خصوص در زنان باردار امری ضروری به نظر می‌رسد [۱۲،۱۳،۱۴]. از این رو، با توجه به عدم وجود الگوی مشخص مقاومتی درعفونت‌های ادراری زنان باردار، مطالعه حاضر با هدف بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تعیین توانایی تشکیل بیوفیلم در سویه‌های *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* ایزوله شده از ادرار زنان باردار مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهر کرمان انجام شد.

روش کار:

جمع آوری نمونه، جداسازی و شناسایی میکروبی

در این مطالعه مقطعی – توصیفی، نمونه ادرار زنان باردار مراجعه-کننده به نه بیمارستان و آزمایشگاه تشخیص طبی شهرستان کرمان در بهار ۱۳۹۶ مورد ارزیابی واقع شدند. حجم نمونه مورد نیاز با استفاده از فرمول محاسبه حجم نمونه برای مطالعات مقطعی و با در نظر گرفتن p =۰/۵، دقت d =۰/۰۷ و ۱۰٪ احتمال ریزش نمونه ها ، ۱۰۷ نمونه محاسبه شد. بدین ترتیب نمونه ادرار ۱۰۷ زن باردار که جهت مراقبت پره ناتال بـه مراکز بهداشتی مراجعه کرده بودند و برای شرکت در طرح رضایت داشتند جمع آوری شد. قبل از دریافت نمونه، آموزش لازم برای تحویل صحیح ادرار میانی داده شد. بر این اساس ادرار میانی بیماران در ظروف استریل جمع آوری و در کمتر از ۲۰ دقیقه در شرایط استریل با استفاده از لوپ استاندارد ۰/۱ میلی لیتر از نمونه ادرار بر روی محیط های اختصاصی ای ام بی اگار و بلاد آگار کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت، نمونه هایی که تعداد کلنی رشد کرده بر روی آنها برابر یا بیش از 10^5 میکرو ارگانیسم در هر میلی لیتر از ادرار بود از نظر عفونت ادراری مثبت گزارش شدند [۱۴]. به منظور تأیید ایزوله ها، رنگ آمیزی گرم و آزمون های تشخیصی شامل اکسیداز، اوره آز، SIM، TSI، سیمون سیترات، لیزین دکربوکسیلاز، MR-VP و کاتالاز انجام شد [۱۵].

تعیین حساسیت میکروبی

دو روش زیر بعد از تشخیص نهایی برای تعیین الگوی حساسیت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک استفاده شد:

الف) انتشاردیسک (کربی بائر). دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده بر حسب میکروگرم شامل آمپی‌سیلین (۱۰)، آمیکاسین (۳۰)، کوتریموکسازول(۱/۲۵)، نالیدیکسیک اسید (۳۰)، سفیکسیم (۵)، سفتریاکسون (۳۰)، سفالوتین (۳۰)، سفوتاکسیم(۳۰)، سیپروفلوکساسین (۵)، جنتامایسین (۱۰)، تتراسایکلین (۳۰)، ایمی پنم (۱۰)، تری‌متوپریم (۵)، نیتروفورانتوئین (۳۰۰)، سفالکسین (۳۰)، آموکسی‌سیلین (۲۰)، کاناماسین (۳۰) و پیپراسیلین (۱۰۰) بود. محیط‌های کشت مورد استفاده در این پژوهش ساخت شرکت، های مدیا (هندوستان) و مرک (المان) و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده ساخت شرکت پادتن طب (ایران) بود. دراین روش پس از تلقیح باکتری درمحیط نوترینت براث، نمونه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه شیکر دار (۲۰۰ دور بر دقیقه) قرار گرفت. سپس با اضافه نمودن سرم فیزیولوژی استریل، غلظت باکتری ها معادل استاندارد نیم مک فارلند تنظیم شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون مذکور بر روی محیط مولرهینتون آگار بصورت یکنواخت گسترده شد و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با فواصل ۲ سانتی متر بر روی آن قرار گرفتند. پس از ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری دردمای۳۷ درجه سانتی‌گراد، نتایج بررسی شدند. قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها با خط کش مخصوص بر اساس میلی متر اندازه‌گیری و در سه گروه حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش شد و نتایج آن بر اساس معیارهای مربوط به موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی(CLSI, 2015) مورد بررسی قرار گرفت [۱۶،۱۷].

ب) حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC). برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده رشد از رقیق‌سازی اگار استفاده شد. در این روش رقت‌های ۱ تا ۱۰۲۴ میکروگرم بر میکرولیتر از ۲ آنتی‌بیوتیک ایمی پنم و آمیکاسین به پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون اگار اضافه گردید و پس ازتلقیح سوش‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. آخرین رقتی که رشد سوش ها در آن متوقف شد معادل حداقل غلظت

ممانعت کننده از رشد آن آنتی‌بیوتیک محاسبه شد و نتایج آن بر اساس معیارهای CLSI انتشار یافته در سال ۲۰۱۵ مورد بررسی قرار گرفت [۱۶،۱۷].

بررسی تشکیل بیوفیلم

جهت سنجش توانایی تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه*، ابتدا هیدروفوبیسیتی سطح سلولی (CSH) تعیین و سپس شاخص آبگریزی (HI) طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$HI = (A_{600nm}-B_{600nm})/A_{600nm}\times 100$$

(A_{600nm}: جذب نوراولیه ، B_{600nm}: جذب نورپس از ترکیب با زایلین)

بر این اساس، ابتدا سویه‌های باکتریایی در نوترینت براث کشت و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از هر کشت به لوله‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر نوترینت براث یک دوم اضافه و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور (۲۰۰ دور بر دقیقه) ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از اتمام مدت زمان گرمخانه-گذاری، جذب نور سوسپانسیون ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. پس از آن به سوسپانسیون ها، زایلین اضافه و بعد از ۵ دقیقه ورتکس و سپس ۱۵ دقیقه استراحت، مایع رویی توسط سمپلر جدا و رسوب ته لوله به کووت منتقل و جذب نور آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. در پایان میزان هیدروفوبیسیتی هر نمونه با استفاده از فرمول HI محاسبه شد. ایزوله های با HI بالاتر از ۷۰ درصد به شدت آب گریز و ایزوله های با HI پایین‌تر از ۳۰ درصد به شدت آب دوست در نظر گرفته شدند[۱۶،۱۸،۱۹،۲۰].

ایزوله‌های با هیدروفوبیسیتی بالاتر از ۷۰ درصد و پایین‌تر از ۳۰ درصد برای بررسی توان تشکیل بیوفیلم بر سطوح شیشه‌ای و پروپیلن انتخاب شدند. پس از اتمام دوره گرمخانه گذاری ۲۴ ساعته در نوترینت براث، ۰/۱ میلی‌لیتر از سوپانسیون میکروبی به لوله‌های شیشه ای و پروپیلن حاوی ۱۰ میلی‌لیتر نوترینت براث یک دوم اضافه شد. تمامی کشت ها به مدت ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد تحت شرایط تکان (۲۰۰ دور بر دقیقه) و همچنین سکون گرمخانه شدند. بعد از گذشت ۷۲ ساعت، لوله‌ها توسط آب مقطر استریل به آرامی شسته شدند و رنگ آمیزی توسط کریستال ویوله انجام شد. بعد از این مرحله به هر کدام از لوله‌ها اتانول ۹۵ درصد اضافه و بعد از گذشت چند دقیقه محتوای لوله‌ها داخل کووت ریخته شد و جذب نور آن ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده و با هم مقایسه شد [۱۶و۲۱]. سپس میزان بیوفیلم بر روی سطح کاتترهای ادراری و همچنین تاثیر دو آنتی‌بیوتیک موثر آمیکاسین و ایمی‌پنم (انتخاب شده بر اساس نتایج آزمون های آنتی بیوگرام و MIC) بررسی شدند. در این ارتباط ایزوله‌های مورد استفاده، به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در نوترینت براث یک دوم حاوی یک دوم و یک چهارم از حداقل غلظت مهاری هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها کشت داده شدند. پس از اتمام دوره انکوباسیون، آنتی‌بیوتیک‌ها با دو بار شستشو با نرمال سالین استریل و سانتریفوژ (۶۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) از سوسپانسیون جدا شدند. سوسپانسیون باقیمانده با اضافه کردن نرمال سالین استریل به کدورت نیم مک-فارلند رسانده شد. کشت‌های بدون آنتی‌بیوتیک به عنوان شاهد استفاده شدند. کاتترهای بریده شده به طول ۱/۵ سانتی متر در لوله‌های حاوی سوسپانسیون استاندارد غوطه ور و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. این کاتترها به لوله‌های حاوی ۱۵میلی‌لیتر نرمال سالین استریل منتقل شدند و با تکان دادن باکتری‌های غیر چسبنده جدا سازی شدند. بعد از آن هر قطعه کاتتر بر سطح یک پلیت ۱۰ سانتی‌متر حاوی نوترینت اگار غلطانده شد و بعد از یک دوره گرمخانه گذاری ۲۴ ساعته در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تعداد کلنی‌های باکتریال شمارش شد. تعدادکلنی‌ها نشان‌دهنده تعداد باکتری‌هایی است که به سطح کاتتر چسبیده‌اند. نتایج بر حسب لگاریتم دهدهی تعداد کلنی‌های شمارش شده گزارش شد [۱۶،۱۸، ۱۹]. در مطالعه حاضر برای تحلیل نتایج آماری از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ و آزمون کای مربع و جهت رسم نمودارها و جداول از نرم افزار اکسل نسخه ۲۰۰۷ استفاده شد. در تمامی تحلیل‌ها P کمتراز ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنادار در نظر گرفته شد. همچنین از سویه های استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 و *اشریشیا کلی* HB101 به عنوان کنترل کیفی استفاده شد.

یافته‌ها:

پس از انجام کشت‌های باکتریایی و آزمایش‌های بیوشیمیایی از ۱۰۷ نمونه ادراری، ۸۰ کشت مثبت حاصل شد که *اشریشیا کلی* با ۳۵ مورد (۴۳/۷۵ درصد) (IAUK۳۵۰۱–۳۵۳۵) و *کلبسیلا پنومونیه* با ۱۵ مورد (۱۸/۷۵ درصد) (IAUK۳۵۳۶–۳۵۵۰) فراوان‌ترین عوامل دخیل در عفونت‌های ادراری باکتریال زنان باردار شناخته و برای بررسی در مراحل بعد انتخاب شدند.

الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* حاصل از ادرار زنان باردار مبتلا به عفونت ادراری در این مطالعه نشانگر بیشترین موارد حساسیت ایزوله‌های مزبور در ارتباط با آنتی‌بیوتیک‌های ایمی پنم وآمیکاسین بود (جدول ۱).

حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد دو آنتی بیوتیک آمیکاسین و ایمی پنم در برابر ۳۵ ایزوله *اشریشیا کلی* و ۱۵ ایزوله *کلبسیلا پنمونیه* مورد بررسی قرار گرفت. ۹۰ درصد سویه ها به غلظت های ۴ میکروگرم بر میلی لیتر و کمتر در مورد هر دو آنتی بیوتیک حساس بودند. حساسیت به ایمی پنم در مقایسه با آمیکاسین در هر دو ایزوله بالاتر بود.

از ۵۰ نمونه مورد بررسی در آزمون CSH با اندازه‌گیری جذب نور در ۶۰۰ نانومتر، ۸ ایزوله با هیدروفوبیسیتی بالای ۷۰ درصد، ۱۷ ایزوله با هیدروفوبیسیتی پایین۳۰ درصد و ۲۵ ایزوله با هیدروفوبیسیتی بین ۷۰–۳۰ درصد گزارش شدند. سویه های استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 و *اشریشیا کلی* HB101 به عنوان کنترل کیفی استفاده شدند (جدول ۲).

نتایج حاصل از بیوفیلم، برای هشت ایزوله با هیدروفوبیسیتی بیشتر از ۷۰ درصد و نه ایزوله با هیدروفوبیسیتی کمتر از۳۰ درصد در لوله‌های شیشه‌ای و پروپیلن و در دو حالت سکون و تکان نشان داد که ایزوله‌های با هیدروفوبیسیتی بیشتر از ۷۰ درصد در لوله‌های پروپیلن و در حالت تکان، میزان جذب نور بالاتری در ۶۰۰ نانومتر دارند (نمودار۱ و شکل ۱).

در ادامه پژوهش، *اشریشیا کلی* IAUK۳۵۰۹ و *کلبسیلا پنومونیه* IAUK۳۵۴۲ (دو ایزوله با بیشترین میزان هیدروفوبیسیتی) برای بررسی تولید بیوفیلم بر سطح کاتتر ادراری با تأثیر یک دوم و یک چهارم از MIC ایمی‌پنم و آمیکاسین (غلظت ۲ میکروگرم بر میلی لیتر)، مورد مطالعه قرار گرفتند. مجاورت محیط ها با MIC × ۰/۲۵ (۰/۵ میکرو گرم بر میلی لیتر) و MIC× ۰/۵ (۱ میکرو گرم بر میلی لیتر) از آنتی بیوتیک های ایمی‌پنم و آمیکاسین، توانایی چسبندگی بر سطح کاتتر هر دو ایزوله را به طور چشمگیری کاهش داد. با مقایسه تأثیر غلظت‌های مختلف دو آنتی‌بیوتیک، اضافه کردن یک دوم از میزانMIC ، در هر دو مورد مهارکنندگی بالاتری نسبت به میزان یک چهارم نشان داد. کاهش تعداد اتصال باکتری و تولید بیوفیلم بر سطح کاتتر ادراری با کشت کنترل (فاقد آنتی‌بیوتیک) مقایسه شد (جدول۳).

جدول ۱: درصدحساسیت ایزوله های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنمونیه*نسبت به ۱۸ آنتی بیوتیک در تست آنتی بیوگرام به روش انتشار از دیسک

آنتی بیوتیک	*کلبسیلا پنمونیه* (٪)	*اشریشیا کلی* (٪)
آمیکاسین	۹۰/۰۰	۸۸/۵۸
جنتامایسین	۸۴/۷۲	۸۴/۵۱
سیپروفلوکساسین	۲۸/۰۴	۴۸/۰۴
سفتریاکسون	۴۸/۷۹	۵۲/۱۱
سفکسیم	۴۶/۳۵	۴۷/۰۰
تتراسایکلین	۵۹/۹۲	۴۷/۹۲
سفالوتین	۵۶/۰۹	۶۶/۰۶
سفوتاکسیم	۴۸/۷۰	۵۳/۹۰
نالیدیکسیک اسید	۲۹/۱۸	۳۲/۱۹
کوتریماکسازول	۴۷/۵۱	۳۹/۲۲
سفالکسین	۵۱/۲۱	۳۹/۰۸
آمپی سیلین	۷/۵۷	۳/۴۸
نیتروفورانتوئین	۸۳/۶۳	۸۰/۰۹
کانامایسین	۷۱/۰۷	۷۹/۰۷
ایمی پنم	۹۱/۲۴	۹۰/۵۹
تری متوپریم	۵۹/۰۲	۶۰/۸۸
آموکسی سیلین	۸/۰۰	۷/۰۰
پیپراسیلین	۲۴/۸۲	۱۹/۴۳

جدول ۲: ایزوله های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنمونیه* با ضریب هیدروفوبیسیتی بالای ۷۰ درصد

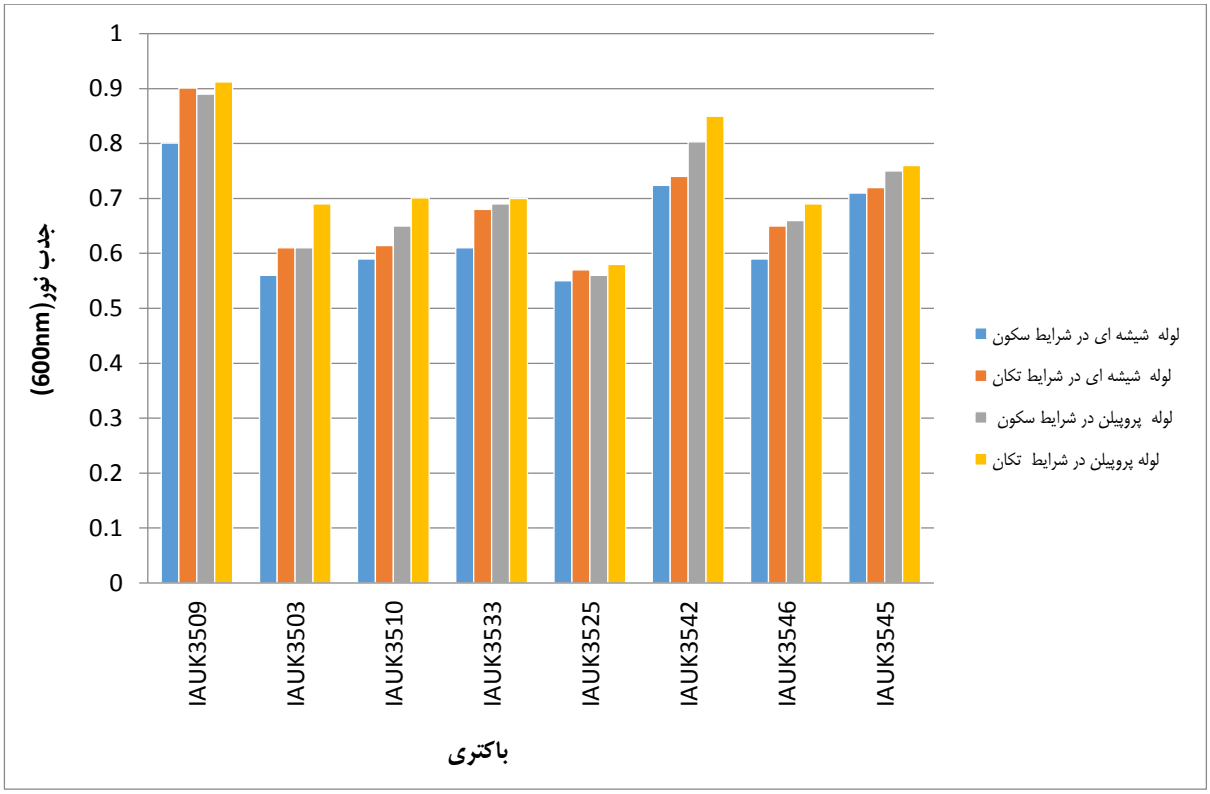
باکتری	٪ HI****
اشریشیا کلی (IAUK۳۵۰۹*)	۷۳٫۲۳
اشریشیا کلی (IAUK۳۵۰۳)	۷۲٫۹۰
اشریشیا کلی (IAUK۳۵۱۰)	۷۲٫۵۰
اشریشیا کلی (IAUK۳۵۳۳)	۷۱٫۵۳
اشریشیا کلی (IAUK۳۵۲۵)	۷۰٫۹۵
کلبسیلا پنومونیه (IAUK۳۵۴۲)	۷۳
کلبسیلا پنومونیه (IAUK۳۵۴۶)	۷۲٫۹۹
کلبسیلا پنومونیه (IAUK۳۵۴۵)	۷۲٫۱۰
سودوموناس آئروژینوزا **PAO1	۷۳٫۳۴
اشریشیا کلی HB101 ***	۸٫۰۰

*ایزوله ها بر مبنای کد (IAUK) شماره گذاری شدند.

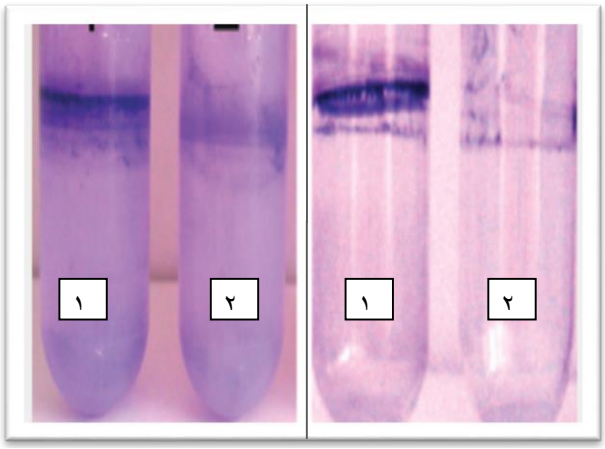
** *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1: سویه استاندارد (هیدروفوبیسیتی بالا).

*** *اشریشیا کلی* HB101 : سویه استاندارد (هیدروفوبیسیتی پایین).

**** HI : ضریب هیدروفوبیسیتی.



نمودار ۱: مقایسه جذب نور (۶۰۰ nm) در آزمایش بیوفیلم ایزوله های با هیدروفوبیسیتی بیشتر از ۷۰ درصد در لوله‌های شیشه‌ای و پروپیلن در شرایط سکون و تکان



(ب) (الف)

شکل۱: تشکیل بیوفیلم توسط *اشریشیا کلی* (IAUK۳۵۰۹)، (الف) بر سطح پروپیلن (۱- متحرک، ۲-ثابت) و (ب) بر سطح شیشه (۱- متحرک، ۲- ثابت)

جدول ۳: تاثیر آنتی بیوتیک ایمی پنم و آمیکاسین بر تعداد ایزوله (Log_{10}) متصل برسطح کاتترهای اداری

آنتی بیوتیک	باکتری	کنترل (بدون آنتی‌بیوتیک)	کشت با (۰/۲۵ ×MIC)	کشت با (۰/۵ ×MIC)
ایمی پنم	*اشرشیا کلی (LAUK ۳۵۰۹)*	۴/۵۰	۳/۶۰	۳/۴۶
	کلبسیلا پنومونیه (IAUK$_{۳۵۴۲}$)	۴/۲۲	۳/۴۷	۰
آمیکاسین	*اشرشیا کلی (LAUK ۳۵۰۹)*	۳/۹۸	۳/۶۵	۳/۴۷
	کلبسیلا پنومونیه (IAUK۳۵۴۲)	۴/۶۰	۳/۵۵	۳/۴۹

بحث:

عفونت‌های ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های ایجاد شده در انسان است و پس از عفونت‌های تنفسی، بیش‌ترین علت مراجعه به پزشکان در گروه‌های مختلف سنی است [۱۲]. نتایج این پژوهش حاکی از آن است که باکتری‌های گرم منفی شایع‌ترین عامل عفونت ادراری بوده و در بین آنها، *اشریشیا کلی* با۴۳/۷۵ درصد و *کلبسیلا پنومونیه* با۱۸/۷۵ درصد بیشترین فراوانی را دارا می‌باشند. این یافته ها مشابه با اکثر مطالعاتی است که در ایران و کشورهای دیگر به دست آمده است[۱۲،۲۲،۲۴]. دراین مطالعه، بیشترین موارد مقاومت ایزوله‌ها به ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین و بیشترین میزان حساسیت به ترتیب مربوط به ایمی‌پنم، آمیکاسین و جنتامایسین گزارش شد. در مطالعه مولازاده و همکاران در جهرم، در ۹۹/۷ درصد افراد تحت مطالعه، عامل عفونت مجاری ادراری، باکتری‌های گرم منفی بودند. در اکثریت ایزوله‌ها، بیشترین میزان مقاومت در برابر آمپی سیلین و کمترین میزان مقاومت مربوط به آمیکاسین بودکه با نتایج مطالعه حاضر هم خوانی دارد [۱۲]. در پژوهش مولانا و همکاران در زابل، *اشریشیاکلی* با ۴۸/۶ درصد و*کلبسیلا پنومونیه* با ۱۷/۹درصد شایع‌ترین ارگانیسم‌های عامل عفونت ادراری بودند. بیشترین موارد حساسیت و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در میان ارگانیسم‌های مولد عفونت دستگاه ادراری، به ترتیب مربوط به سیپروفلوکساسین و آمپی‌سیلین بوده است که صرفاً از لحاظ حساسیت به سیپروفلوکساسین با نتیجه مطالعه حاضر مغایرت دارد [۲۲]. در تهران نیز براساس نتایج مطالعه حمیدی و همکاران *اشریشیا کلی* شایع‌ترین ایزوله با بیشترین و کمترین حساسیت به ترتیب نسبت به نیتروفورانتوئین و آمپی‌سیلین معرفی شد که همخوان با نتایج پژوهش حاضر است [۲۳]. در بررسی محمدی و همکاران درشهر خرم آباد مطابق با نتایج مطالعه حاضر *اشریشیا کلی* با میزان ۷۳/۹ درصد شایع ترین باکتری جدا شده از کشت ادرار بود. در این مطالعه مقاوم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها آمپی‌سیلین ۹۸/۴ درصد و آموکسی‌سیلین ۸۳/۷ درصد و حساس‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها آمیکاسین۹۳/۳ درصد و نیتروفورانتوئین ۸۹/۸ درصد گزارش شد[۲۴]. در مطالعه گزمو و همکاران در اتیوپی، ادیمی و همکاران در نیجریه و عبداللهی و همکاران در تهران در

بررسی شیوع، تنوع و مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های ایزوله شده از عفونت‌های ادراری، *اشریشیا کلی* شایع‌ترین گرم منفی پاتوژن با الگوی مقاومتی مشابهی با مطالعه حاضر شناخته شد [۲۵، ۲۶و۲۷]. رانگری و همکاران در هند، فراوانی ایزوله‌های *اشریشیا کلی* و*کلبسیلا پنومونیه* را به ترتیب ۶۰ و۴۰ درصد اعلام کردند. در این بررسی *اشریشیا کلی* بالاترین میزان حساسیت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی‌پنم ۹۸/۸۸درصد، نیتروفورانتوئین ۹۷/۲۲ درصد و آمیکاسین ۹۲/۷۷ درصد نشان داد. مقایسه نتایج پژوهش حاضر با نتایج این پژوهش حاکی از روند کاهش حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های فوق است [۳۰]. دلایل مختلفی برای این تفاوت ها قابل تصور است. از آن جمله می توان به تعداد افراد مورد مطالعه، دقت در نمونه گیری و آزمایش، تأخر و تقدم زمان انجام پژوهش و مکان پژوهش اشاره کرد. وجود این گونه تفاوت ها، ضرورت بررسی منطقه ای و موردی مقاومت آنتی بیوتیکی در فواصل زمانی مشخص را توجیه می کند.

با اندازه گیری هیدروفوبیسیته سطح سلولی در سویه‌های *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه*، ۱۶ درصد از ایزوله‌ها هیدروفوبیسیتی بالای ۷۰ درصد ، ۳۴ درصد از ایزوله‌ها هیدروفوبیسیتی پایین تر از ۳۰ درصد و ۵۰ درصد از ایزوله‌ها هیدروفوبیسیتی بین ۷۰-۳۰ درصد نشان دادند. سویه‌های با هیدروفوبیسیتی بالای ۷۰ درصد، توان بیشتری در تولید بیوفیلم بر سطح پروپیلن و حالت تکان در مقایسه با سطح شیشه و حالت سکون نشان دادند. کواکس نقش حرکت در تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در خانواده انتروباکتریاسه ایزوله شده از عفونت ادراری را مورد بررسی قرار داد. نتایج پژوهش وی حاکی از توان بالاتر ایزوله‌های متحرک در ایجاد بیوفیلم و بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالاتربود. نتایج پژوهش حاضر نیز با این یافته‌ها مطابقت دارد [۲۸]. در بررسی تشکیل بیوفیلم و حساسیت به جنتامایسین توسط ناپارستک برای ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* ایزوله های با جذب نور بالاتر توانایی بالاتری برای تشکیل بیوفیلم داشتند. این ایزوله‌ها همچنین مقاومت بالاتری در برابر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین از خود نشان دادند در پژوهش حاضر نیز ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* با هیدروفوبیسیتی بالا و توان تولید بیوفیلم بیشتر، مقاومت بالاتری را نیز در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها از خود بروز دادند[۲۹].

یکی از وجوه اهمیت مقاومت آنتی بیوتیکی، در رابطه با مصرف آنتی بیوتیک های پیشگیری کننده است که معمولاً به اکثر بیماران قبل از دریافت سوند، آنتی بیوتیک‌های پیشگیری کننده به منظور کاهش باکتری اوری تجویز می شود. در این پژوهش با توجه به این که نمونه شاهد، بدون دریافت آنتی بیوتیک و نمونه دوم و سوم پس از صرف آنتی بیوتیک با غلظت‌های مختلف بررسی شده است، نتایج حاکی ازکاهش تعداد سویه‌های باکتریایی پس از مصرف آنتی بیوتیک می‌باشد. البته بعضی از پژوهشگران تأثیر این گونه آنتی بیوتیک‌ها را محدود به همان چند روز اول سوند گذاری می‌دانند، ولی عده‌ای دیگر معتقد به تجویز آنتی‌بیوتیک‌های پروفیلاکتیک در سوندگذاری‌های طولانی مدت هستند و مصرف آن را به ویژه برای بیمارانی توصیه می کنند که در ریسک بالای عفونت های مجاری ادراری قرار دارند [۳۱].

نتیجه‌گیری:

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تعداد قابل توجهی از آنتی‌بیوتیک‌های معمول مورد بررسی که در بیمارستان ها استفاده می‌شوند، عملاً در درمان درصد بالایی از عفونت‌های ادراری ناشی از *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* کارآمد نیستند و استفاده از آن ها در درمان، علاوه بر بالا رفتن هزینه‌های درمانی سبب بروز هر چه بیشتر مقاومت نیز می شود، در نتیجه ضروری است که رژیم درمانی تجویز شده توسط پزشکان بر اساس نتایج آنتی‌بیوگرام آزمایشگاه میکروبشناسی بالینی باشد. علاوه بر این، نتایج حاصل از این بررسی نشان داد سویه های ایجادکننده عفونت دستگاه ادراری در افراد باردار علاوه بر مقاومت آنتی بیوتیکی فردی دارای مقاومت گروهی به شکل بیوفیلم قابل انتقال از طریق کاتترهای ادراری نیز هستند.

به منظور کاهش آلودگی سیستم ادراری با باکتری ها به ویژه در دوران بارداری و یا درمان عفونت‌های ادراری ناشی از سوندگذاری، تجویز دو آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم و آمیکاسین با گزارش بالاترین میزان حساسیت،به عنوان رژیم پروفیلاکتیک و یا به عنوان رژیم درمانی و نیز حذف آمپی-سیلین و آموکسی‌سیلین به همراه بالاترین میزان مقاومت، در پروتکل درمانی توصیه می‌شود.

این مطالعه همچنین نشان داد که در شهرستان کرمان آنتی-بیوتیک‌های ایمی‌پنم و آمیکاسین همچنان می‌توانند در صورت لزوم به عنوان داروهای موثر برای درمان عفونت‌های ادراری ناشی از *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* در زنان باردار به کار روند.

تعارض منافع:

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

References:

1. Ayoyi AO, Kikuvi G, Bii C, Kariuki S. Prevalence, aetiology and antibiotic sensitivity profile of asymptomatic bacteriuria isolates from pregnant women in selected antenatal clinic from Nairobi, Kenya. Pan Afr Med J. 2017; 26(1):41.
2. Rohini UV, Reddy GS, Kandati J, Ponugoti M. Prevalence and associate risk factors of asymptomatic bacteriuria in pregnancy with bacterial pathogens and their antimicrobial susceptibility in a tertiary care hospital. Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol. 2017; 6(2):558-62.
3. Smaill FM, Vazquez JC. Antibiotics for asymptomatic bacteriuria in pregnancy. Cochrane Database Syst Rev. 2015; 8:CD00490.
4. Ghafari M, Baigi V, Cheraghi Z, Doosti-Irani A. The prevalence of asymptomatic bacteriuria in Iranian pregnant women: a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2016; 11(6):e0165114.
5. Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, Gillespie B, Sobel JD. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. Ann Epidemiol. 2000; 10(8):509-515.
6. Lüthje P, Brauner A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. Adv Microb Physiol, 2014; 65(4):337-372.
7. AgarwalJ, Srivastava S, Singh M. Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*. Indian J Med Microbiol. 2012; 30(2):141-149.
8. Jalilian S, Rokhbakhsh-Zamin F. Evaluating the ability of Biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from clinical samples in Zahedan.Pars Journal of Medical Sciences. 2017; 15(1): 36-42.
9. Khodadadian R, Khorshidi A, Safari M, Gilasi HR. Prevalence of metallo-beta-lactamase enzyme and patern of antibiotic resistance in *Klebsiellapnomoniae* isolated from patients with urinary tract infection in Qom city during 2013-2014. Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences. 2017; 21(4):390-397.
10. Amini F, Karimpour HA, Hasani Sh, Mohamadi S, Azizi M. Antibiotic resistance pattern of urinary tract infection pathogens in children of Kermanshah in 2015. Razi Journal of Medical Sciences. 2017; 24(155):20-27.
11. Jalilian S, Farahani A, Mohajeri P. Antibiotic resistance in uropathogenic Escherichia coli isolated from urinary tract infections out-patients in Kermanshah. Int J Med Public Health. 2014; 4(1):75-81.
12. Molazade A, Shahi A, Najafipour S, Mobasheri F, Norouzi F, Abdollahi Kheirabadi S,Ashraf Mansuri J, Gholami MS. Antibiotic Resistance Pattern of Bacteria CausingUrinary Tract Infections in Children of Fasa During the Years 2012 and 2014. Journal ofFasa University of Medical Sciences. 2015; 4(4): 492-499.
13. Aghamahdi F, Hashemian H, Shafiei M, Akbarian Z, Rostam Nejad M, Fallah Karkan M. Etiologies andantibiotic resistance patterns in infants with urinary tractinfections hospitalized in children medical center, Rasht,Iran. Iran J Neonatal IJN. 2013; 4(2):21-25.
14. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Study Guide for Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Missouri. Mosby Elsevier; 2007.
15. Kazemipour N, Dusane DH, Dhakephalkar PK, Rokhbakhsh-Zamin F, ZinjardeSS, Chopade BA. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolatedfrom urinary tract infection and urinary catheters. FEMS Immunol Med Microbio. 2011; 162(3):328-338.
16. Azemat Eslamtalab E, Kazemipour N. Biofilm formation and antibiotic resistance of*Acinetobacter* spp. isolated from skin and wound infections. IJBPAS. 2015; 4(10):568-576.
17. National Committee for Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty five informational supplement. 2015; 35(3):45-154.
18. Jones DS, Adair CG, Mawhinney WM, Gorman SP. Standardization and comparison of methods employed formicrobial cell surface hydrophobicity and chargedetermination. Int J Pharm. 1996; 131(1): 83–89.
19. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA.Attachment to and biofilm formation on abiotic surfacesby *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a novelchaperone usher pili assembly system. *Microbiology*. 2003; 149(12): 3473–84.
20. O'Toole GA, Pratt LA, Watnick PI, Newman DK, Weaver VB, Kolter R. Genetic approaches to the study of biofilms.Method Enzymol. 1999; 310(1):91–109.
21. Moulana Z, Asgharpour F, Ramezani T. Frequency of the Bacterial Causing Agents in Urinary Tract Infection and Antibiotic Pattern Samples Sent to Razi Laboratory, Babol 2008-2009: A Short Report. 2012; 6(12):489-494.
22. Hamidi-Farahani R, Tajik AR, Noorifard M, Keshavarz A, Taghipour N, Hossieni-Shokouh J. Antibiotic resistance pattern of *Escherichia coli*isolated from urineculture in 660 Army clinical laboratory center in Tehran 2008. J Army Univ Med Sci. 2012; 10 (1) : 45-49
23. Mohammadi M, Ghasemi E, Mokhayeri H, Pournia Y, Boroun H.Antimicrobial Resistance Patterns of *Escherichia coli*Detected from Hospitalized Urine Culture Samples. Asian Journal of Biological Sciences. 2010; 3(4):195-201.
24. Gezmu T, Regasa B, Manilal A, Mama M, Hailu T, Merdekios B. Prevalence, diversity and Antimicrobial Resistance of uropathogenic bacterial isolates sourced from the UTI patients of Arba Minch Province, Ethiopia. iMedPub Journals. 2016; 7(3):81-86.
25. Adeyemi AO, Evbaziegbere Gideon E, Eromosele IH, Evelyn Chimerenma A, Sunday Oladokun O, Eunice Ogochukwu U, et al. Antibiotics Susceptibility Patterns of some Uropathogens to Nitrofurantoin and Nalidixic Acid among Pregnant Women with Urinary Tract Infections in Federal Medical Centre, Bida, Niger-State, North Central,

Nigeria. American Journal of Epidemiology and Infectious Disease. 2014; 2(4):88-92.
26. Abdolahi AR, Mehr Azma M. Evaluation of antibiotic susceptibility and resistance in urinary infections, Imam Khomeini Hospital, Tehran. Journal of Jahrom University of Medical Sciences. 2009; 7(9):59-66.
27. Kovács B. The role of bacterial hypermutation in biofilm formation and antibiotic resistance in urinary tract infections caused by pathogens of the Enterobacteriaceae family. PhD Thesis. Rennes, France: Université de Rennes; 2014.
28. Naparstek L, Carmeli Y, Navon-Venezia Sh, Banin E. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella 23neumonia*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2014; 69(4):1027-1034.
29. Rangari A, Sharma S, Tyagi N, Singh P, Singh G, Thakur R. Antibiotic Susceptibility Pattern of Bacterial Uropathogens Isolated from Patients at a Tertiary Care Hospital in Western Uttar Pradesh of India. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 2015; 4(10): 646-657
30. 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):279-284.
31. Fasalu Rahiman OM, Balasubramanian T, Shejina M, Mohthash Musambil: A Review on Urinary Tract Infection in Pregnancy. International Journal of Pharma Research & Review. 2015; 4(2):26-33.

Original Article

Biofilm formation and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* strains isolated from pregnant women in Kerman, Iran

Sima Pooyan[1], Nadia Kazemipour[1*], Farokh Rokhbakhsh-Zamin[1]

Received: 2019/02/27 Revised: 2019/04/17 Accepted: 2019/05/2

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

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.17, No.1, Spring 2019

Pars J Med Sci 2019;17(1):15-24

Abstract:

Introduction:
Urinary tract infections are the common medical problems in pregnant women and associated bacteria produce biofilm which protects them from antibiotics. Aim of this study was to determine the pattern of antibiotic resistance and biofilm formation by Escherichia coli and Klebsiellapneumoniae isolated from urine of pregnant women in Kerman, Iran.

Methods and Materials:
107 urine samples were collected from pregnant women. Identification was performed by biochemical tests. Antibiotic sensitivity by disc diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC) by agar dilution method were performed. The cell surface hydrophobicity (CSH) behavior of those strains and their ability to form biofilm on glass and propylene surfaces was evaluated in static and shake conditions. The effect of antibiotics on biofilm formation ability was also determined on the catheter surface.

Results:
From 80 positive cases, 35 isolates of Escherichia coli and 15 isolates of Klebsiella pneumoniae were selected for this research. The Maximum resistance and sensitivity of isolates were observed about amoxicillin and imipenem, respectively. All isolates with CSH higher than 70% showed better biofilm formation even though on propylene in shaking state. Treatment of culture with 0.5 MIC (µg/ml) and 0.25 MIC (µg/ml) of selected antibiotics significantly reduced the adhesion ability of isolates.

Conclusion:
The survey therefore came to the conclusion that similar researches should be continuously repeated in different medical centers to test antimicrobial susceptibility as well as diagnosing and quantifying biofilm infection which surely achieved data help to find appropriate therapeutic way against UTI in pregnancy.

Keywords: UTI, Pregnant Women, Escherichia Coli, Klebsiella Pneumonia, Antibiotic Resistance, Biofilm

* Corresponding author Email: nadia_kazemi@yahoo.com