

الگوی پلاسمیدی سویه‌های پروتئوس میرابیلیس و پروتئوس ولگاریس مولد بیوفیلم در

نمونه‌های بیمارستانی کرمان در سال ۱۳۹۰

هوشنگ شیخ بردسیری^۱، محمدرضا شکیبایی^{۲*}، صدیقه امینی کافی آباد^۳

خلاصه

مقدمه: ظهور سویه‌های تولیدکننده بیوفیلم پروتئوس مشکل جدی را در درمان عفونت‌های مجاری ادراری وابسته به سوند ایجاد نموده است. هدف از این طرح مطالعه تولید بیوفیلم و الگوی پلاسمیدی ایزوله‌های پروتئوس مرتبط با عفونت ادراری بود. روش: تعداد ۸۸ سویه پروتئوس جدا شده از کشت نمونه‌های بالینی بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های کرمان در طی سال ۱۳۹۰ جمع‌آوری شدند. شناسایی باکتری توسط روش‌های مرسوم میکروبی شناسی صورت گرفت. حساسیت دارویی و حداقل غلظت مهارکننده (MIC) توسط روش‌های انتشار دیسک کبری بائر و E-test انجام شد. تولید بیوفیلم توسط روش‌های میکروتیتر پلیت و میکروسکپ الکترونی Scanning مورد مطالعه قرار گرفت. وجود پلاسمید توسط روش لیز قلیایی در میان سویه‌های تولیدکننده بیوفیلم بررسی شد.

یافته‌ها: از میان افراد مبتلا به عفونت‌های پروتئوس مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های اصلی پور، باهنر و شفا (بستری و سرپایی)، ۵۸٪ زن و ۴۲٪ مرد بودند. دامنه سنی ۲۹ - ۲۰ سال بیشترین تعداد مراجعه‌کنندگان (۷۷/۳۹٪) و دامنه سنی ۶۹ - ۶۰ سال کمترین تعداد مراجعه‌کنندگان (۴۰/۳٪) را داشتند. در مجموع، ۶۷٪ (n=۵۹) ایزوله‌های پروتئوس بیشترین دامنه MIC (۳۲ - ۱۶ $\mu\text{g/mL}$) را نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون و ۴۶٪ (n=۴۱) کمترین MIC (۱ - ۴ $\mu\text{g/mL}$) را به کلرآمفنیکل داشتند. تشکیل بیوفیلم در ۶/۸٪ (n=۶) از ایزوله‌ها منفی بود در حالی که ۱۷٪ (n=۱۵) آنها بیوفیلم قوی داشتند (P<۰/۰۵). بررسی وجود پلاسمید در سویه‌های ایزوله شده نشان داد که ایزوله‌های ۱۹، ۲۴ و ۸۷ که بیوفیلم قوی داشتند همگی دارای یک پلاسمید یکسان با وزن ملکولی بالا بودند و سویه ۲۹ که بیوفیلم قوی داشت هیچگونه پلاسمیدی را نشان نداد. نتیجه‌گیری: اکثر ایزوله‌های پروتئوس جدا شده در این مطالعه مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج برای درمان عفونت‌های این میکروب را داشتند ولی تعداد محدودی توانایی تولید بیوفیلم قوی را داشتند. مطالعه پلاسمیدی این سویه‌ها نشان داد که فقط بعضی از این ایزوله‌ها دارای پلاسمید بودند و همچنین مقاومت بالایی را به چند دارو به‌طور همزمان داشتند. واژه‌های کلیدی: پروتئوس، مقاومت دارویی، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)، بیوفیلم، پلاسمید

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبی شناسی، گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی اصلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۲- دانشیار گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی

افصلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۳- دانشیار آسیب شناسی، سازمان انتقال خون تهران

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: mr_shakibaei@kmu.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۸/۶ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۱/۹/۱۲ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۱۰/۱۳

مقدمه

پروتئوس یک باکتری فرصت طلب و بخشی از فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان است که در آب و خاک نیز یافت می‌شود. این میکروارگانیسم در صورت ورود به دستگاه ادراری، زخم‌ها، یا ریه می‌تواند تبدیل به پاتوژن شود. باکتری پروتئوس معمولاً باعث عفونت ادراری و تشکیل سنگ کلیه می‌شود (۱،۲).

سه گونه‌ی پروتئوس ولگاریس، پروتئوس میرابیلیس و پروتئوس پتری پاتوژن‌های فرصت طلب انسان هستند. پروتئوس شامل گروه پاتوژن‌هایی است که عامل بسیاری از عفونت‌های دستگاه ادراری انسان می‌باشند. بیشتر سویه‌های پروتئوس میرابیلیس در بین افراد جامعه به آمپی‌سیلین و سفالسپورین حساس می‌باشند. پروتئوس ولگاریس به این آنتی‌بیوتیک‌ها حساس نیست. با این وجود، این ارگانیسم، معمولاً تنها افرادی را که از لحاظ سیستم دفاعی ضعیف هستند مورد هدف قرار می‌دهد (۳،۴). حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد سنگ‌های کلیوی سنگ‌هایی هستند که به دلیل قلیایی شدن ادرار در اثر عمل آنزیم اوره آز (که اوره را به آمونیاک و دی‌اکسید کربن تجزیه می‌کند) به وسیله پروتئوس و دیگر باکتری‌ها بوجود می‌آیند (۵،۶).

پروتئوس همچنین در زیستگاه‌های محیطی متفاوتی از قبیل درمانگاه‌های پرستاری با مراقبت‌های دراز مدت و بیمارستان‌ها یافت می‌شود. در محیط بیمارستان غیرطبیعی نیست که باکتری‌های گرم منفی هم در پوست و هم در مخاط دهان بیماران و کارکنان بیمارستان کلونیزه شوند و عفونت به صورت اولیه در این قسمت‌ها بوجود می‌آید. با این وجود، گونه‌های پروتئوس عمدتاً عامل عفونت‌های بیمارستانی محسوب نمی‌شوند (۷،۸).

پروتئوس میرابیلیس مسؤول ایجاد ۹۰ درصد عفونت‌های ناشی از پروتئوس می‌باشد و می‌تواند به عنوان یک عفونت همه گیر محسوب شود. پروتئوس ولگاریس و پروتئوس پتری به سادگی از افراد در بیمارستان‌ها و اماکن با مراقبت طولانی مدت و از بیماران مبتلا به

بیماری‌های حاد مانند سپتی سمی یا دارای سیستم دفاعی ضعیف، جدا می‌شوند (۹).

عفونت‌های ناشی از پروتئوس میرابیلیس اغلب در بیماران بستری در بیمارستان که به آنها سوند وصل شده است دیده می‌شود. این عفونت معمولاً توسط تجهیزات پزشکی از جمله سوند، مرطوب ساز یا نیولایزر (مسؤول استنشاق)، و دستکش معاینه (عفونت زخم) به بیمار منتقل می‌شود (۱۰،۱۱). مطالعات متعددی در زمینه تولید بیوفیلم در سویه‌های مختلف بیمارستانی پروتئوس وجود دارد (۱۲-۱۴). این مطالعات نشان می‌دهد که جنس پروتئوس قادر به ایجاد بیوفیلم روی سطوح پلی استرن، لاتکس و سیلیکون و همچنین روی سطوح بیولوژیک مانند بافت کلیه، مثانه و همچنین زخم می‌باشد. این میکروب به هر دو صورت بیوفیلم خالص و میکس پیدا شده است. مطالعات گزارش یافته در زمینه بیوفیلم در پروتئوس نشان داده که فلاژل باکتری نقش مهمی در ایجاد بیوفیلم بر روی سطوح جدید بازی می‌کند (۱۵). نکته مهم اینکه با تشکیل بیوفیلم این باکتری خود را از اثر تخریبی آنتی‌بیوتیک‌ها مصون می‌نماید. معمولاً سویه‌های تولید کننده بیوفیلم مقاومت به داروهای متعددی را از خود نشان می‌دهند. همچنین تشکیل بیوفیلم در عفونت زخم ایجاد شده توسط پروتئوس سبب مقاومت آنها به آنتی‌سپتیک‌های روتین شده و کمک به انتشار این باکتری‌ها در نسوج زخم می‌کند. همچنین سویه‌های تولید کننده بیوفیلم نقش مهمی در عفونت‌های بیمارستانی مقاوم به چند دارویی پروتئوس از طریق انتقال ژن مقاومت به دارو دارند (۱۶). بیشتر سویه‌های بیمارستانی پروتئوس، قادر به ایجاد بیوفیلم هستند. تشکیل بیوفیلم یکی از مهمترین فاکتورهای ویرولانسی برای این باکتری‌ها محسوب می‌شود (۱۷،۱۸).

در ایران مطالعات اندکی در زمینه بیوفیلم تولید شده توسط سویه‌های پروتئوس صورت گرفته است. مهدوی و همکاران، خاصیت آنتی‌بیوفیلم بعضی از مواد بیوسید مانند عصاره‌های گیاهی را روی سودوموناس آئروژینوزای تولید کننده بیوفیلم مورد مطالعه قرار دادند و متوجه شدند که

تلقیح گردید و سپس با یک لوپ استریل در سطح محیط کشت پخش گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری شدند. جهت تشخیص افتراقی آزمایش‌های استاندارد میکروبی شامل تست اوره از، بررسی رشد در محیط کشت TSI، تولید گاز، تولید H_2S SIM برای بررسی حرکت و تست‌های MR و VP، بررسی سوارمینگ و تست اندول (برای جداسازی گونه میرابیلیس از ولگاریس) بر روی کلنی‌های جدا شده انجام گردید.

تمامی ایزوله‌های پروتئوس شناسایی شده در محیط تریپتیکاز سوی برات (TSB) با ۴۰ درصد گلیسرول تلقیح و در یخچال $20^{\circ}C$ جهت انجام آزمایشات بعدی ذخیره شدند.

حداقل غلظت مهارکننده از رشد

سوسپانسیون میکروبی از ایزوله‌های پروتئوس با کدورت نیم مک فارلند تهیه و 200 میکرولیتر از غلظت 1×10^8 CFU/mL با کتری بر روی محیط کشت مولر هیتتون آگار استریل (Oxid- Hi media) قرار داده شده و با یک سواب استریل در تمام سطح محیط کشت پخش شدند. پس از تلقیح، پلیت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند تا رطوبت سوسپانسیون میکروبی در سطح پلیت تبخیر شود. نوارهای test-E در داخل هر پلیت قرار گرفت. بعد از گذاشتن نوارهای E-test به دلیل انتشار سریع آنتی‌بیوتیک‌ها، از هر گونه جا به جایی نوارها در سطح پلیت جلوگیری شد. سپس پلیت‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در دمای $35^{\circ}C$ درجه سانتی‌گراد قرار داده و عدد محل تلاقی‌هاله با نوار به عنوان MIC در نظر گرفته شد. از سویه استاندارد پروتئوس ATCC 29906 به عنوان کنترل کیفی استفاده شد. میزان حساسیت یا مقاومت پروتئوس بر اساس توصیه‌های (Clinical and Laboratory Standards Institute) CLSI بررسی شد (۲۲). از آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین (Cf)، جنتامایسین (Gm)، سفازولین (CZ)، سفوتاکسیم (CE)، کانامایسین (K)، آمیکاسین (AK)، سفتریاکسون (CI) و کلرآمفنیکل (C) در این تحقیق استفاده شد.

استفاده مؤثر از نیترات نقره، اتیلین دی‌آمین تتراکلرید استیک اسید EDTA باعث توقف و در بعضی موارد باعث کاهش تشکیل بیوفیلم توسط این میکروارگانیسم می‌گردد (۱۹).

محمدی و عبدی با تحقیق بر روی ۴۲ نمونه بالینی پسودوموناس آئروژینوزای گرفته شده از بیمارستان‌های تهران با استفاده از روش پلیت میکرو تیر اصلاح شده و مطالعه میکروسکوپی، نشان دادند که ایزوله‌های میکروبی قادر به تولید بیوفیلم هستند و ثابت شد سویه ۲۱۴ پسودوموناس آئروژینوزا با بیشترین میزان تولید بیوفیلم جذب نوری بیشتری دارد که در مطالعه میکروسکوپی به خوبی مشخص بود (۲۰). افتخار و دادبی با جداسازی ۴۵ نمونه MRSA استاف اورئوس بیوفیلم آنها را مورد مطالعه قرار دادند و متوجه شدند ۵۳٪ از نمونه‌های فوق که تولید بیوفیلم می‌کردند حامل ژن ICA (Intracellular Adhesion) بودند (۲۱). هدف از مطالعه حاضر بررسی تولید بیوفیلم و الگوی پلاسمیدی ایزوله‌های پروتئوس مرتبط با عفونت ادراری بود.

روش بررسی

نمونه‌گیری و تشخیص ایزوله‌های گرفته شده از بیمار

در این مطالعه مقطعی و تجربی، تعداد ۸۱ نمونه پروتئوس جدا شده از کشت نمونه‌های بالینی بیماراران مراجعه‌کننده (بستری و سرپایی) به بیمارستان‌های شفا، افضل پور، و باهنر کرمان از تیر ماه ۱۳۹۰ لغایت تیرماه ۱۳۹۱ جمع‌آوری شد. نمونه‌های ادراری از وسط ادرار به مقدار ۱۰ میلی‌لیتر در ظرف استریل ادراری جمع‌آوری شد. همچنین نمونه‌های جدا شده از کاتتر و زخم با کمک سواب استریل به ۵ میلی‌لیتر محیط استریل ترانسپورت استورات منتقل گردید و بعد از ۱ تا ۲ ساعت به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشکده پزشکی و آزمایشگاه کنترل کیفی سازمان انتقال خون کرمان منتقل گردیدند. برای کشت نمونه‌های ادرار، ۰/۱ میلی‌لیتر ادرار از هر نمونه با استفاده از سرنگ استریل به محیط کشت مک کانکی

ODc = OD cut off

OD = Optical density

= average OD \bar{O}

بررسی تشکیل بیوفیلم توسط میکروسکپ الکترونی (SEM)

مشاهده ایزوله‌های تولید کننده بیوفیلم پروتئوس توسط تکنیک SEM بر اساس روش زیر انجام گردید. سه سویه پروتئوس که تولید بیوفیلم قوی می‌کردند به همراه شاهد منفی انتخاب و به آزمایشگاه میکروسکپ الکترونی SEM دانشگاه فردوسی مشهد ارسال گردید. رشد ۸ ساعت، ۱۶ ساعت و ۲۴ ساعت با کتری در محیط تریپتیکاز سوی برات به‌طور اسپتیک به پلیت پتری استریل حاوی ۱۰ میلی‌لیتر گلو تاردئید ۲٪ منتقل گردید و در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز نگهداری شد. نمونه‌ها بر روی گرید میکروسکپ قرار گرفتند و توسط نانو ذرات طلا پوشانده شدند. سپس از نمونه‌ها توسط میکروسکپ الکترونی با ۲۰KV EHT و PA۲۰۰ به کمک دوربینی با قدرت تفکیک زیاد عکس گرفته شد.

بررسی وجود پلاسمید در نمونه‌های ایزوله شده پروتئوس

استخراج DNA پلاسمیدی به کمک متد لیز قلیایی (۲۴) انجام گرفت. برای جداسازی و مشاهده پلاسمید در ایزوله‌های پروتئوس، از آگارز ژل الکتروفورز ۰/۷ درصد استفاده شد. ۰/۴ گرم آگارز (Merck) در ۵۰ میلی‌لیتر بافر تانک توسط حرارت حل شد و در داخل قالب شانه‌دار ریخته و سرد شد. پس از ساخت ژل، ۴۰ میکرولیتر حاوی DNA پلاسمیدی به داخل هر چاهک به‌طور جداگانه ریخته و ژل در داخل تانک الکتروفورز حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر تریس-بورات (pH- 8.0) قرار گرفت. تانک به مدت ۴ ساعت به منبع الکتریکی با ولتاژ ۶۰ ولت متصل شد. پس از پایان این مدت، ژل با آب به آرامی شستشو داده شد و تحت تابش لامپ UV (260 nm) به کمک دستگاه UV ترانس ایلومیناتور (UV TECH) مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی تولید بیوفیلم در ایزوله‌های بالینی پروتئوس

یک لوپ از کلنی‌های پروتئوس به محیط کشت تریپتی کاز سوی آگار (TSA) حاوی ۰/۱ درصد گلوکز منتقل گردید و در ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. از کلنی‌های رشد یافته یک لوپ برداشته و به محیط TSB حاوی یک درصد گلوکز منتقل و جذب نوری معادل ۰/۱ درصد در طول موج ۶۵۰nm تنظیم گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های بالا به ۶ چاهک موازی در پلیت میکروتیتر (الیزا Reader) دارای ریل ۹۶ چاهک پلی استرن اضافه شد. همچنین از محیط TSB تنها (بدون میکروب) به عنوان شاهد منفی در هشت چاهک استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محتوی چاهک‌ها به آرامی اسپیره و با بافر ۰/۱ مولار فسفات پتاسیم (ایزوتونیک) و یا سرم فیزیولوژی استریل با pH-۷/۵ شسته شدند. سپس ۱۵۰ میکرولیتر متانول خالص به هر چاهک اضافه گردید و پلیت میکرو تیتر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق جهت تثبیت سلول‌های متصل به کف و جدار چاهک قرار داده شد و در مرحله بعد پس از اسپیره متانول از هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله یک درصد به آنها اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه گرماگذاری شدند. پلیت به آرامی جهت حذف اضافه رنگ با آب شیر شسته شد و بعد از خشک شدن در مجاورت هوا، هر چاهک با ۱۶۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد مخلوط شد و با طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط الیزا ریدر (اتریش- Tecan) جذب هر چاهک خوانده شد. برای راست آزمایی آزمایش ۳ بار تکرار گردید. برای مشخص شدن نتایج بیوفیلم ابتدا OD CUT OFF محاسبه و طبق فرمول‌های زیر نتایج بیوفیلم تفسیر شدند (۲۳).

ODc = \bar{O} OD negative control + 3 x SD negative control

OD = \bar{O} OD tested strain - ODc

nO Producing Biofilm: OD \leq ODc

weakly biofilm: ODc < OD \leq 2 x ODc

Moderately biofilm: 2 x ODc < OD \leq 4 x ODc

strongly biofilm 4 x ODC < OD

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SPSS 7.5 انجام گردید. از آزمون آماری χ^2 برای تعیین ارتباط معنی‌دار استفاده شد. $P < 0.05$ به عنوان مقدار معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

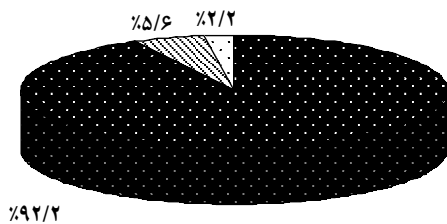
جدول شماره ۱ فراوانی باکتری پروتئوس جدا شده از بیمارستان‌های کرمان را در بین گروه‌های سنی مختلف بیماران طی سال ۱۳۹۰ نشان می‌دهد. از ۸۸ بیمار مبتلا به عفونت پروتئوس، ۴۲٪ (n=۳۷) مرد و ۵۸٪ (n=۵۱) زن بودند. این بیماران دامنه سنی ۱-۶۹ سال داشتند و بیشترین نمونه جدا شده پروتئوس مربوط به گروه سنی ۲۰-۲۹ سال بود. بعد از این گروه سنی بیشترین میزان جداسازی مربوط به گروه سنی ۱۰-۱۹ سال بود. کمترین گروه سنی مراجعه کننده مربوط به گروه سنی ۶۰-۶۹ سال بود. نمودار ۱ محل عفونت توسط ایزوله‌های پروتئوس در بیماران آلوده را نشان می‌دهد. در مجموع ۹۲/۲ درصد از سویه‌های جدا شده مربوط به عفونت‌های دستگاه ادراری بودند ($P \leq 0.05$) که اغلب در خانم‌ها مشاهده گردید. این موضوع ممکن است به دلیل خصوصیات و ویژگی‌های تشریحی دستگاه ادراری خانم‌ها باشد. در این میان ۵/۶۸ درصد نمونه‌های پروتئوس از عفونت‌های زخم جدا شدند و میزان جداسازی از سایر موارد بیمارستانی ۲/۲ درصد بود. در این مطالعه بیشترین میزان ایزوله‌های جدا شده به ترتیب مربوط به بیمارستان‌های افضلی پور (۷۳٪)، باهنر (۲۲٪)، شفا (۳٪) و کاشانی (۲٪) بودند. از میان ۸۸ سویه جدا شده، تنها ۷ عدد تست اندول مثبت (ایزوله‌های ۷، ۶۸، ۱۹، ۳۱، ۷۳، ۴۳ و ۸۱) بودند و بقیه اندول منفی داشتند. این نشان می‌دهد که اکثر ایزوله‌ها متعلق به گونه میرابیلیس هستند و فقط هفت ایزوله بالا متعلق به گونه ولگاریس می‌باشند.

جدول ۱. توزیع فراوانی سویه‌های ایزوله شده پروتئوس بر اساس محدوده سنی در شهر کرمان در سال ۱۳۹۰

محدوده سنی (سال)	تعداد (n)	درصد
۱-۹	۱۰	۱۱/۳۶
۱۰-۱۹	۱۵	۱۷/۰۴
۲۰-۲۹	۳۵	۳۹/۸۷
۳۰-۳۹	۱۲	۱۳/۳۶
۴۰-۴۹	۶	۶/۱۸
۵۰-۵۹	۷	۷/۵۹
۶۰-۶۹	۳	۳/۴۰
جمع بیماران	۸۸	۱۰۰

Mean \pm SD = ۳۹ \pm ۰/۰۷

سایر موارد □ عفونت رحم □ عفونت اندراری ■



نمودار ۱. فراوانی سویه‌های پروتئوس جداسازی شده از نمونه‌های بالینی براساس محل عفونت

میزان مقاومت و حساسیت دارویی ایزوله‌های بیمارستانی پروتئوس در جداول شماره ۲ و ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که در جداول دیده می‌شود، بیشترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون (۶۷٪، n=۵۹) و کمترین آنها مربوط به آنتی‌بیوتیک کلرآمفنیکل (۴۶/۵٪، n=۴۱) بود. پروتئوس‌های ایزوله شده همچنین MIC کمتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و سفوتاکسیم داشتند. مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزید به ترتیب آمیکاسین، جنتامایسین و کانامایسین از مقاوم به حساس بود. بیشتر از نیمی از ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم مقاوم بودند.

جدول ۲. حساسیت و مقاومت دارویی سویه‌های ایزوله شده بیمارستانی پروتئوس

آنتی بیوتیک	حساس		بینابینی		مقاوم	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
کلرامفنیکل	۴۷	٪۵۳/۴۰	۲۱	٪۲۳/۸۶	۲۰	٪۲۲/۷۲
کانامایسین	۳۹	٪۴۴/۳۱	۲۳	٪۲۶/۱۳	۲۶	٪۲۹/۵۴
جتتامایسین	۳۵	٪۳۹/۲۷	۱۶	٪۱۸/۱۸	۳۷	٪۴۰/۰۴
سیپروفلوکساسین	۴۱	٪۴۶/۵۹	۱۹	٪۲۱/۵۹	۲۸	٪۳۱/۸۱
سفتو تاکسیم	۴۱	٪۴۶/۵۹	۱۶	٪۱۸/۱۸	۳۱	٪۳۵/۲۲
سفتریاکسون	۲۹	۳۲/۹۵	۱۹	٪۲۱/۵۹	۴۰	٪۴۵/۴۵
سفازولین	۳۰	٪۳۴/۰۹	۱۱	٪۱۲/۵	۴۷	٪۵۳/۴۰
آمیکاسین	۳۶	٪۴۰/۹	۱۱	٪۱۲/۵	۴۱	٪۴۶/۵۹

محیط کشت مولر هینتون آگار برای حساسیت و مقاومت دارویی استفاده شد.

حساسیت و مقاومت هر سویه با آنتی بیوتیک‌های بالا بر اساس استاندارد مقایسه گردید.

مقدار اینوکولوم 1×10^8 (نیم مک فارلند) رسانده شد.

جدول ۳. حداقل غلظت مهارکننده (MIC) سویه‌های پروتئوس ایزوله شده از بیمارستان‌های شهر کرمان بر علیه

۸ آنتی بیوتیک در درمان عفونت ادراری

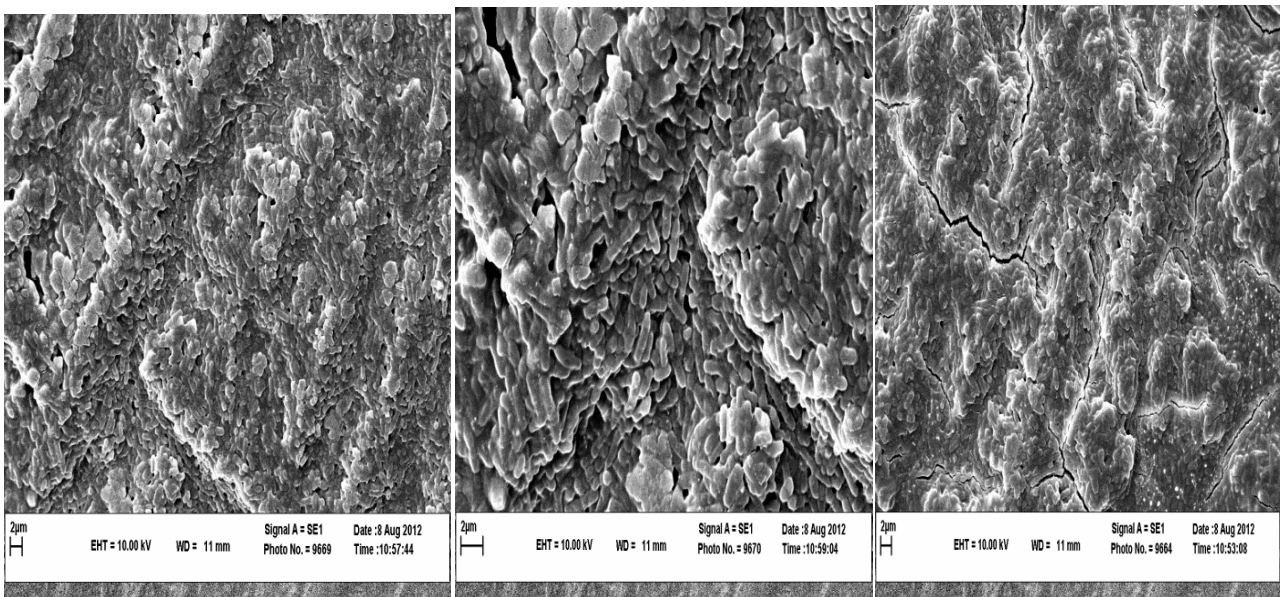
MIC 90	MIC (µg/mL) MIC 50	MIC range	آنتی بیوتیک
۶۴	۱۶	۸-۶۴	کلرامفنیکل
۴	۰/۵	۱-۴	سیپروفلوکساسین
۶۴	۱۶	۴-۶۴	آمیکاسین
۱۶	۴	۴-۱۶	جتتامایسین
۳۲	۸	۸-۳۲	کانامایسین
۶۴	۸	۲-۶۴	سفتو تاکسیم
۳۲	۱۶	۱۶-۳۲	سفتریاکسون
۳۲	۸	۴-۳۲	سفازولین

MIC50=حداقل غلظت مهارکننده برای ۵۰٪ سویه‌ها

MIC90=حداقل غلظت مهارکننده برای ۹۰٪ سویه‌ها

برای دقت بیشتر و درستی کار همزمان با انجام تست کنترل منفی حاوی محیط تریپتوکیس سوی براث و رنگ کریستال ویوله به کار برده شد. نمونه‌ها به صورت دوپلیکیت گذاشته شد و اپتیکیال دانسیته آنها با یکدیگر و با کنترل منفی مقایسه گردید. شکل ۱ شدت بیوفیلم در میان ایزوله‌های پروتئوس به روش میکروتیتر را نشان می‌دهد.

مطالعه شدت بیوفیلم در بین این ایزوله‌ها نشان داد که ۶/۸۱٪ (n=۶) از آنها هیچ بیوفیلمی را تشکیل ندادند در حالی که ۳۶٪ (n=۳۲) بیوفیلم ضعیفی و ۳۹٪ (n=۳۵) بیوفیلم متوسطی تشکیل دادند. همچنین ۱۷٪ (n=۱۵) بیوفیلم قوی تشکیل دادند.



ج

ب

الف

شکل ۱. تصاویر میکروسکپ الکترونی از زمان‌های مختلف بیوفیلم

الف- بیوفیلم پروتئوس در مراحل اولیه ۸ ساعت پس از نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

ب- بیوفیلم پس از ۱۶ ساعت نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

ج- بیوفیلم پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد

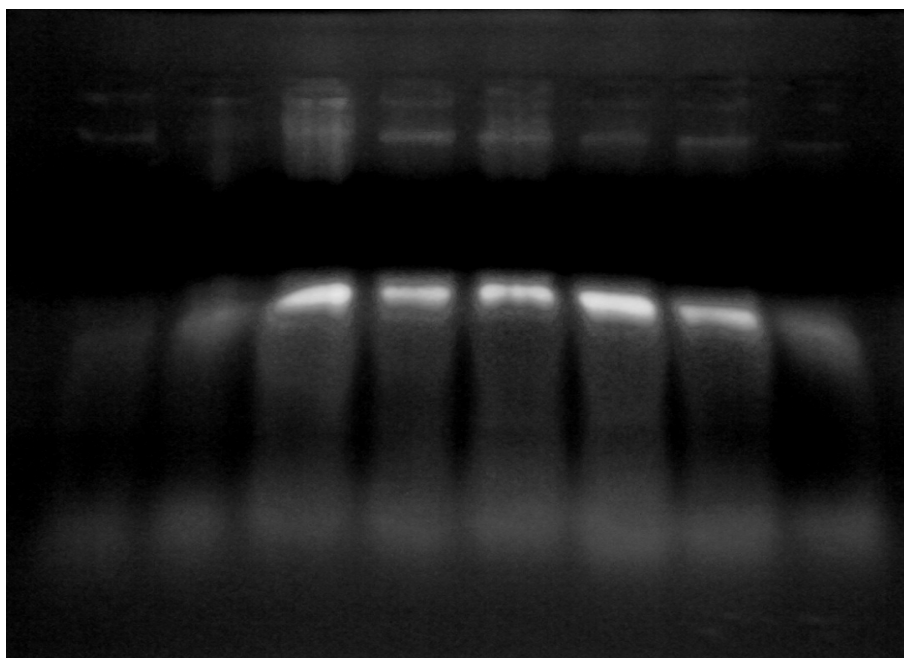
(شکل ۱-الف) نسبت به زمان ۱۶ ساعت (شکل ۱-ب) و مدت زمان ۲۴ ساعت (شکل ۱-ج) مشاهده گردید. بررسی و مطالعه وجود پلاسمید در میان ایزوله‌هایی که تولید بیوفیلم می‌کردند و همچنین مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از خود نشان می‌دادند، نشان داد که ایزوله‌های ۱۹، ۲۴ و ۸۷ بیوفیلم قوی داشته و همگی دارای یک پلاسمید یکسان با وزن ملکولی بالا بودند که در شکل ۳ نشان داده شده است. ایزوله ۱۹ نسبت به

تشکیل بیوفیلم در سوبه‌های پروتئوس ایزوله شده از بیمارستان‌های کرمان به کمک روش میکروسکپ الکترونی تأیید شد که در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل از میکروسکپ الکترونی نشان داد که با افزایش مدت زمان نگهداری ایزوله‌ها در سطح پلیت پلای استرن میزان بیوفیلم تشکیل شده افزایش یافته به طوری که میزان کمتری بیوفیلم در مدت زمان ۸ ساعت

مطالعه وجود پلاسمید در سویه ۲۹ که بیوفیلیم قوی داشت هیچگونه پلاسمیدی را نشان نداد (شکل ۲). این امر نشان می‌دهد که احتمالاً ژن تولید بیوفیلیم در این ایزوله کروموزومی است. این ایزوله همچنین به داروهای جنتامایسین، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفازولین و آمیکاسین مقاوم بود. همچنین ایزوله‌های ۷، ۳۱ و ۸ دارای یک باند پلاسمیدی اضافی با وزن ملکولی بالا بودند.

آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین ($MIC=16$)، سفروفلوکساسین ($MIC=4$)، سفتریاکسون ($MIC=64$)، سفازولین ($MIC=32$) و آمیکاسین ($MIC=64$) مقاوم بود. همچنین ایزوله ۲۴ نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کلرآمفنیکل ($MIC=32$)، سفوتاکسیم ($MIC=64$)، سفتریاکسون ($MIC=64$)، سفازولین ($MIC=32$) و آمیکاسین ($MIC=64$) مقاوم بود و بیوفیلیم قوی نیز داشت. همین الگو در مورد ایزوله ۸۷ نیز مشاهده گردید.

۱۹ ۲۹ ۸ ۳۱ ۷ ۵۷ ۲۴ ۵۴



شکل ۲. الگوی پلاسمیدی در ایزوله‌های تولیدکننده بیوفیلیم و مقاوم به داروی پروتئوس ایزوله شده از بیمارستان‌های کرمان.

Line 1: ایزوله شماره ۱۹ Line 2: ایزوله شماره ۲۹ Line 3: ایزوله شماره ۸ Line 4: ایزوله شماره ۳۱ Line 5: ایزوله شماره ۷

Line 6: ایزوله شماره ۵۷ Line 7: ایزوله شماره ۲۴ Line 8: ایزوله شماره ۵۴

زیادی از بیماران ممکن است باعث ایجاد عفونت‌های ناشی از وجود سوند شود.

بیشترین و مشخص‌ترین عارضه مرتبط با این مسئله ایجاد عفونت‌های ادراری بیمارستانی است که به عفونت‌های مرتبط با کاتتر (Catheter-Associated urinary tract infection: CAUTIs) معروف‌اند. عفونت‌های ادراری ناشی از سوند نه تنها به دلیل

بحث

سوند ادراری وسیله پزشکی استاندارد است که در بیمارستان و درمانگاه برای خارج نمودن ادرار از افرادی که به هر دلیلی قادر به ادرار کردن نمی‌باشند استفاده می‌شود. استفاده فراوان و گاهی غیرالزامی سوندهای ادراری (۵۰ - ۲۱ درصد) در حین بستری شدن در بیمارستان در تعداد

آنتی‌بیوتیک کلرآمفنیکل کمترین مقاومت ایزوله شده همچنان MIC=1-4 ± 0 / 0.8 μg/mL) را داشتند. پروتئوس‌های آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین (MIC=1-4 ± 0 / 0.5 μg/mL) و سفوتاکسیم (MIC=4-8 μg/mL) داشتند. دلیل مقاومت کمتر ایزوله‌ها به کلرآمفنیکل ممکن است مربوط به عدم استفاده از این دارو به صورت روتین در بیمارستان باشد. در نتیجه میکروب‌ها تماس کمتری با این دارو داشته و مقاومت کمتری نیز به وجود می‌آید. از نتایج بالا می‌توان چنین استنباط کرد که آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و سفوتاکسیم می‌توانند به‌طور مؤثرتری بر علیه عفونت‌های ادراری ناشی از کاتتر مورد استفاده قرار گیرند.

تعداد 17/4٪ (n=15) از ایزوله‌ها تولید بیوفیل قوی کردند که اغلب آنها مقاومت دارویی نسبت به چند دارو به‌طور همزمان داشتند. بنابراین تصور می‌شود که تولید بیوفیل نقش مهمی در ایجاد مقاومت دارویی داشته باشد.

در مطالعه‌ای که بر روی 300 نمونه ادراری از بیمارستان امام خمینی تهران انجام شده، پس از باکتری اشریشیا کلی، پروتئوس با 11 مورد جایگاه متوسطی را اشغال کرده بود و نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام ایزوله‌ها نشان داد که آمیکاسین، نالیدیکسیک اسید، اوفلوکساسین و سیپروفلوکساسین دارای بیشترین اثر بودند (32).

بر اساس یک مطالعه دیگر بیوفیل در اکثر کاتترها وجود داشته و ضخامت بیوفیل، پوشش سطحی کاتتر و همچنین مقدار آگزوپلی ساکارید به‌صورت معنی‌داری در بیماران باکتریمیک در مقایسه با بیماران بدون باکتریمی زیادتر است (33).

در بررسی حاضر در میان ایزوله‌هایی پروتئوسی که تولید بیوفیل می‌کردند، مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک مشاهده شد و ایزوله‌های 19، 24 و 87 که بیوفیل قوی داشتند همگی دارای یک پلاسمید یکسان با وزن ملکولی بالا بودند. این امر ممکن است امکان ارتباط بین تولید بیوفیل، مقاومت دارویی و پلاسمید باشد که باید توسط آزمایشات بعدی نظیر PCR و کلونینگ تأیید شود.

فراوانی آنها بلکه به دلیل هزینه بالای اقتصادی و همچنین عوارض ناخواسته بعدی (سپتی سمی - باکتریمی) از اهمیت زیادی برخوردارند (25، 26).

در مطالعه حاضر اکثر نمونه‌های جدا شده، از زنان مبتلا به عفونت‌های ادراری بودند و بیشترین بیماران چه مرد و چه زن در دامنه سنی 29-20 سال بودند (P≤ 0/5). در میان ایزوله‌های پروتئوس جدا شده از بیماران، 17٪ (n=15) تولید بیوفیل قوی کرده در حالی که 39٪ (n=35) آنها بیوفیل متوسط و 36٪ (n=32) بیوفیل ضعیف داشتند. در این بررسی تشکیل بیوفیل به وسیله روش میکروتیتر بررسی و توسط میکروسکپ الکترونی Scanning مورد تأیید قرار گرفت. نتایج نشان داد که با گذشت زمان مقدار و شدت بیوفیل افزایش می‌یابد؛ به طوری که در 8 ساعت اول مقدار خیلی کمی بیوفیل ساخته شد در حالی که طی 24 ساعت مقدار بیوفیل افزایش قابل ملاحظه‌ای پیدا نمود. این امر ممکن است به این دلیل باشد که زمانی که تشکیل بیوفیل توسط اتو ایندیوسر (خود القاء) و سیستم QS آغاز می‌شود مراحل بعدی به صورت اتوماتیک و خود بخودی انجام می‌شود که در مطالعات توسط محققین دیگر نیز مطرح شده است (27، 28). بر اساس یکی از مطالعات گذشته شکل سوبسترای جامد که سطح سوند را می‌پوشاند در تشکیل بیوفیل نقش دارد (29).

در مطالعه‌ای که بر روی سوبه‌های پروتئوس تولیدکننده بیوفیل در کشور آرژانتین انجام شده، سوبه‌های تولیدکننده بیوفیل اغلب به داروی سیپروفلوکساسین مقاوم بوده و آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون هیدروژناز سطح بالاتری در مقایسه با سوبه‌های پلانکتونیک برخوردار بودند (30).

در تحقیق دیگری بر روی پروتئوس میرابلیس، بیوفیل در 69 کاتتر از 75 کاتتر مورد مطالعه در بیماران دریافت‌کننده طولانی مدت کاتتر مشاهده گردید (31).

در بررسی حاضر از میان 88 ایزوله بیمارستانی پروتئوس، 67٪ (n=59) نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتریاکسون بیشترین مقاومت (MIC=16-32 ± 0 / 0.5 mg/ml) و 46/5٪ (n=41) نسبت به

References

1. Trautner BW, Darouiche RO. Role of Biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *Am J Infect Control* 2004; 32(3): 177-83.
2. Liedl B. Catheter-associated urinary tract infections. *Curr Opin Urol* 2001; 11(1):75-9.
3. Krajden S, Fuksa M, Petrea C, Crisp L.G, Penner JL. Expanded clinical spectrum of infections caused by *Proteus penneri*. *J Clin Microbiol* 1987; 25(3): 578-9.
4. Adler JL, Burke JP, Martin DF, Finland M. Proteus Infections in a General Hospital. Biochemical Characteristics and Antibiotic Susceptibility of the Organisms: With Special reference to Proticine Typing and the Dienes Phenomenon. *Ann Intern Med* 1971; 75(4): 517-30.
5. Hola V, Peroutkova T, Ruzicka F. Virulence factors in Proteus bacteria from biofilm communities of catheter-associated urinary tract infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; 65(2): 343-9.
6. Mobley HL, Warren JW. Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters. *J Clin Microbiol* 1987; 25(11): 2216-7
7. Johnson DE, Russell RG, Lockett CV, Zulty JC, Warren JW, Mobley HL. Contribution of *Proteus mirabilis* urease to persistence, urolithiasis and acute pyelonephritis in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* 1993; 61(7): 2748-54
8. Saint S, Chenoweth CE. Biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Infect Dis Clin North Am* 2003; 17(2): 411-32.
9. Ramsay JW, Garnham AJ, Mulhall AB, Crow RA, Bryan JM, Eardley I, et al. Biofilms, bacteria, and bladder catheters: a clinical study. *Br J Urol* 1989; 64(4): 395-8.
10. Stickler D, Ganderton L, King J, Nettleton J, Winters C. Proteus mirabilis biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Urol Res* 1993; 21(6): 407-11.
11. Sharp PM, Saenz CA, Martin RR. Amikacin (BB-K8) treatment of multiple-drug-resistant proteus infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; 5(5):435-8.
12. Matsukawa M, Kunishima Y, Takahashi S, Takeyama K, Tsukamoto T. Bacterial colonization on intraluminal surface of urethral catheter. *Urology* 2005; 65(3): 440-4.
13. Warren JW. Catheter-associated urinary tract infections. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11(3): 609-22.
14. Allison C, Coleman N, Jones PL, Hughes C. Ability of *Proteus mirabilis* to invade human urothelial cells is coupled to motility and swarming differentiation. *Infect Immun* 1992; 60(11): 4740-6.
15. Adegbola RA, Old DC, Senior BW. The adhesins and fimbriae of *Proteus mirabilis* strains associated with high and low affinity for urinary tract. *J Med Microbiol* 1983; 16(4):427-31.
16. Ghigo JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 2001; 412(6845): 442-5.
17. Jacobsen SM, Shirtliff ME. *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Virulence* 2001; 2(5): 460-5
18. Stickler DJ and Morgan SD. Modulation of crystalline Proteus mirabilis Biofilm development on urinary catheters. *J Med Microbiol* 2006; 55(pt 5): 489-94.

19. Mahdavi M, Jalali M, Kermanshahi K. The Assessment of Biofilm Formation in Iranian Meat Processing Environments. *Research Journal of Microbiology* 2008; 3: 181-6.
20. Mohammadi M, Abdi A. Biofilm production in *Pseudomonas aeruginosa* by Microtiter test and electron microscope. *Medical Journal of Artesh* 2005; 2 (1): 295-9 [Persian].
21. Eftekhari F, Dadaei T. Biofilm formation and detection of ica AB genes in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2011; 14(2): 132-6.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-S17, January 2007.
23. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, Ruzicka F. 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.
24. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids Research* 1979; 7(6): 1513-23.
25. Tenke P, Kovacs B, Jackel M, Nagy E. The role of biofilm infection in urology. *World J Urol* 2006; 24(1): 13-20
26. Tambyah PA, Halvorson KT, Maki DJ. A prospective study of pathogenesis of catheter-associated urinary tract infections. *Mayo Clin Proc* 1999; 74(2): 131-6.
27. Aiassa V, Barnes A. I, Albesa I. Resistance to ciprofloxacin by enhancement of antioxidant defenses in biofilm and planktonic *Proteus mirabilis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 393(1): 84-8.
28. Jones SM, Yerly J, Hu Y, Ceri H, Martinuzzi R. Structure of *Proteus mirabilis* biofilms grown in artificial urine and standard laboratory media. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 268(1):16-21.
29. Morris NS, Stickler DJ. Encrustation of indwelling urethral catheters by *Proteus mirabilis* biofilms growing in human urine. *J Hosp Infect* 1998; 39(3):227-34.
30. Cox AJ, Hukins DW. Morphology of mineral deposits on encrusted urinary catheters investigated by scanning electron microscopy. *J Urol* 1989; 142(5): 1347-50.
31. Stickler DJ. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Na Clin Pract Urol* 2008; 5(11): 598-608.
32. Dalal MM, Mirshafie A, Zeraati H, Bakhtiyari R. Plasmid pattern of *Proteus* isolated from urinary tract patients. *Daneshvar* 2006; 13(62): 29-34 [Persian].
33. Jones S.M, Ravani P, Hemmelgarn BR, Muruve D, MacRae JM. Morphometric and Biological Characterization of Biofilm in Tunneled Hemodialysis Catheters. *Am J Kidney Dis* 2011; 57(3): 449-55.

Plasmid Pattern of Biofilm Producing *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* among Clinical Isolates in Kerman University Hospitals during 2011-2012

Sheykh-Bardsiri H., M.Sc.¹, Shakibaie M.R., Ph.D.^{2*}, Amini Kafiabad S., Ph.D.³

1. Postgraduate Student of Microbiology, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

2. Associate Professor of Microbiology, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

3. Associate Professor of Pathology, Tehran Blood Transfusion Organization, Tehran, Iran

* Corresponding author; e-mail: mr_shakibaie@kmu.ac.ir

(Received: 27 Oct. 2012 Accepted: 2 Jan. 2013)

Abstract

Background & Aims: Emergence of biofilm producing *Proteus* strains created a serious problem in the treatment of catheter-associated urinary tract infections. The aim of this research was to study biofilm production and plasmid pattern of *Proteus* strains associated with Urinary tract infection.

Methods: A total of 88 strains of *Proteus* were isolated from samples collected in hospitals of Kerman/ Iran during 2011-2012. The isolates were identified by routine microbiological tests and antibiotic sensitivity tests were carried out by disk diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) by E-test methods. Biofilm production was studied by microtiter plate method and confirmed by Scanning electron microscope. Plasmids from biofilm producing isolates were detected by alkaline lysis technique.

Results: From 88 patients infected by *Proteus*, 58% were female and 42% were male. The most and the least frequent age ranges were respectively 20-29 years old (77.39 %) and 60-69 years old. From all isolates, 40.69 % (n=59) showed the highest MIC range (16-32±0.05 µg/mL) to ceftriaxone whereas, 59% [n=41] exhibited the least MIC range to chloramphenicol (1-4±0.08 µg/mL). Biofilm production was positive for 17% (n=15) of the isolates and 6 % (n=6) did not show any biofilm (P≤ 0.05). Plasmid isolation from biofilm producing isolates revealed that strains number 87, 24 and 19 that produced strong biofilm all carried similar high molecular weight (M. Wt) plasmid. While strain 29 that showed strong biofilm did not have any plasmid.

Conclusion: It can be concluded that the majority of isolates of *Proteus* were resistant to routine antibiotics and limited number of them could produce biofilm. Majority of the biofilm producing isolates contained a similar high M. Wt. plasmid.

Keywords: *Proteus*, Antibiotic resistance, Microbial sensitivity test, Biofilm, Plasmids