

بررسی اثر اکسید نیتریک بر سویه‌های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک مولد بیوفیلم جدا شده از بیماران

چکیده

دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۵ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۵/۳۱ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۴ آنلاین: ۱۴۰۳/۰۷/۰۱

فاتح رحیمی^{۱*}، ساناز خاشعی^۲

۱- بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

۲- گروه میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

زمینه و هدف: به دلیل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان سویه‌های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک نیاز مبرم به توسعه راهکارهای درمانی جدید جهت مدیریت عفونت‌های ادراری می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر اکسید نیتریک بر بیوفیلم سویه‌های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری بود.

روش بررسی: در این مطالعه در مجموع ۳۸۱۴ ایزوله مشکوک به اشرشیا کلای از یک آزمایشگاه پاتوبیولوژی در محدوده مرکزی شهر تهران در بازه زمانی خرداد ۱۴۰۱ لغایت اردیبهشت ۱۴۰۲ جمع‌آوری و با پرایمرهای اختصاصی ژن *tufA* مورد تایید قرار گرفتند. جهت بررسی توانایی تولید بیوفیلم از روش‌های کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت استفاده شد. همچنین، حضور ژن‌های *bcsA*، *yedQ*، *cdgD* و *csga* در سویه‌های مولد بیوفیلم و تعیین اثر اکسید نیتریک بر تشکیل و تخریب بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: از میان تمامی ایزوله‌های مورد تایید، در مجموع ۱۳۰۹ سویه مولد بیوفیلم و واجد مورفوتایپ‌های *rdar* (کورلای و سلولز+) (۵۲٪)، *bdar* (کورلای+) (۲۷٪) و *pdar* (سلولز+) (۲۱٪) بودند. همچنین ۵۲٪، ۳۱٪ و ۱۷٪ سویه‌ها به ترتیب مولد بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف بودند و فراوانی ژن‌های *bcsA*، *yedQ*، *cdgD* و *csga* نیز به ترتیب محدود به ۸۷٪، ۹۸٪، ۱۰۰٪ و ۷۹٪ سویه‌ها بود. غلظت ۳۰ میکرومولار اکسید نیتریک به طور معناداری باعث کاهش تشکیل بیوفیلم (۴۰٪-۱۷) و افزایش تخریب بیوفیلم (۴۵٪-۲۰) شد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه موید کاربرد اکسید نیتریک به عنوان یک عامل ضدبیوفیلمی برای سویه‌های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک بود.

کلمات کلیدی: بیوفیلم‌ها، اکسید نیتریک، عفونت ادراری، اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک.

* نویسنده مسئول: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، بخش میکروبیولوژی.

تلفن: ۰۳۱-۳۷۹۳۲۴۷۱

E-mail: f.rahimi@sci.ui.ac.ir

مقدمه

هستند.^{۱-۳} عوامل باکتریایی مختلفی از دسته باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌توانند باعث ابتلا افراد به عفونت ادراری شوند که در بین آنها اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک به عنوان مهمترین و فراوانترین عامل ایجاد عفونت‌های ادراری پیچیده (Complicated UTI) و ساده (Uncomplicated UTI) در سراسر جهان شناخته می‌شود، که در این میان ۷۵٪ از موارد ابتلا به عفونت‌های ادراری ساده در جهان ناشی از

عفونت‌های دستگاه ادراری از جمله شایعترین عفونت‌های باکتریایی به‌شمار می‌روند که سالانه باعث ابتلا ۱۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان شده و در میان عفونت‌های بیمارستانی، پس از عفونت‌های دستگاه تنفسی تحتانی، از بالاترین میزان برخوردار

روش بررسی

جمع‌آوری و شناسایی ایزوله‌های اشرشیا کلای، در یک بازه زمانی یازده ماهه از خرداد ۱۴۰۱ لغایت اردیبهشت ۱۴۰۲، در مجموع ۵۸۳۷ نمونه ادرار متعلق به بیماران مبتلا به عفونت ادراری از یک آزمایشگاه پاتوبیولوژی در محدوده مرکزی شهر تهران، جمع‌آوری گردید. تمامی بیماران سرپایی و فاقد سوند در مجاری ادراری بودند. در نهایت ۳۸۱۴ ایزوله (۶۵٪) اشرشیا کلای جداسازی گردید. سپس هر ایزوله بر محیط ژلوز مک‌کانکی (Merck, Germany) کشت داده شد و کلنی‌های صورتی رنگ به محیط ژلوز ائوزین متیلن بلو (Merck, Germany) منتقل شدند. در نهایت تمامی ایزوله‌های واجد کلنی صورتی رنگ بر روی محیط ژلوز مک‌کانکی که همراه و یا بدون جلاهی سبز متالیک بر محیط ژلوز ائوزین متیلن بلو بودند، با آزمون PCR مورد تأیید قرار گرفتند.^۹ شناسایی مولکولی سویه‌های اشرشیا کلای، جهت استخراج DNA از ایزوله‌های مشکوک به اشرشیا کلای، روش جوشاندن مورد استفاده قرار گرفت.^{۱۰} همچنین، برای شناسایی و تایید ایزوله، از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *tufA* (جدول ۱) براساس پروتکل پیشین استفاده گردید.^۹ طول قطعه مورد انتظار نیز برای این ژن ۲۰۰ جفت باز بود.^{۱۰} بررسی توانایی تشکیل بیوفیلیم، به منظور بررسی توانایی تشکیل بیوفیلیم در میان سویه‌های اشرشیا کلای جداسازی شده از دو آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت استفاده شد.^۹ در روش کیفی، پس از کشت یک کلنی از هر سویه بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو و ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، کلنی‌ها به چهار مورفوتایپ (Morphotype) (براساس توانایی تولید کورلای و سلولز) saw (Smooth and white) (کورلای- و سلولز-)، pdar (Pink, dry and rough) (کورلای- و سلولز+)، bdar (Brown, dry and rough) (کورلای+ و سلولز-) و rdar (Red, dry and rough) (کورلای+ و سلولز+) تقسیم‌بندی شده و مورفوتایپ‌های bdar و pdar به عنوان سویه‌های بیوفیلیم مثبت جهت بررسی و تایید در آزمون کمی انتخاب شدند. در آزمون کمی نیز در ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از کشت باکتری در محیط آگوست لوریا برتانی (Luria-Bertani, LB) بدون نمک (Scharlau, Barcelona, Spain) در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه تلقیح شد.

این باکتری می‌باشد.^۳ تشکیل بیوفیلیم توسط سویه‌های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک در سطح و یا داخل سلول‌های پوششی مثانه و همچنین بر روی سوندهای ادراری، از دلایل عمده ایجاد عفونت‌های پایدار به‌شمار می‌رود که منجر به عود عفونت و افزایش نرخ مرگ‌ومیر ناشی از این عفونت می‌شود.^۴

بیوفیلیم‌ها با ایجاد یک مانع فیزیکی باعث مهار نفوذ آنتی‌بیوتیک به سلول باکتری شده و به‌عنوان مخزنی برای گسترش و انتقال ژن‌های مختلف از جمله ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی عمل نموده و به‌همین دلیل تشکیل بیوفیلیم به‌عنوان سازوکار اصلی تحمل آنتی‌بیوتیکی (Antibiotic tolerance) در باکتری‌ها شناخته می‌شود.^۵ بنابراین، توسعه روش‌های جدید برای ریشه‌کن کردن سلول‌های پلانکتونیک و به‌ویژه بیوفیلیم‌ها امری کاملاً ضروری می‌باشد.

در میان روش‌های گوناگون، استفاده از اکسید نیتریک می‌تواند یک راهکار مناسب برای مبارزه با عفونت‌های باکتریایی باشد، زیرا اکسید نیتریک براساس میزان دوز مورد استفاده می‌تواند مستقیماً باکتری‌های پلانکتونیک را از بین ببرد و یا باعث پراکندگی بیوفیلیم‌ها شود.^۶

پراکندگی بیوفیلیم‌ها می‌تواند بر سازوکارهای خاص و ذاتی تحمل آنتی‌بیوتیکی ناشی از تولید بیوفیلیم غلبه کند و علاوه بر این ممکن است بدون کشتن مستقیم باکتری‌ها از ایجاد مقاومت جلوگیری کند.^۷

همچنین، اکسید نیتریک می‌تواند درمان آنتی‌بیوتیکی را تقویت کند و نشان داده شده است که استفاده از آزادکننده‌های اکسید نیتریک مانند سدیم نیتروپروساید، گلیسرین تری نترات، ایزوسوربید مونونترات و ایزوسوربید دی نترات همراه با آنتی‌بیوتیک‌ها حتی سویه‌های مقاوم به دارو را از بین می‌برد.^۷ این آزادکننده‌ها و مشتقات آنها بر روی باکتری‌های دیگری از جمله هلیکوباکتر هم تاثیرگذار بوده و از طرفی دیگر استفاده از آنها در افراد مبتلا به مشکلات زمینه‌ای کبد باید با احتیاط صورت گیرد.^۸

باتوجه به موارد مطرح شده، این مطالعه با هدف بررسی اثر اکسید نیتریک بر تشکیل و تخریب بیوفیلیم سویه‌های اشرشیا کلای جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه‌کننده به یک آزمایشگاه پاتوبیولوژی خصوصی در شهر تهران در سال‌های ۱۴۰۱-۱۴۰۲ به انجام رسیده است.

جدول ۱: توالی پرایمرها و برنامه حرارتی مورد استفاده در آزمون‌های PCR

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه (جفت‌باز)	برنامه حرارتی
<i>tufA</i>	F: 5'-TGGTTGATGACGAAGAGCTG-3' R: 5'-GCTCTGGTCCGGAATGTAA-3'	۲۰۰	94°C: 5 min, 35 cycles (94°C: 30 S, 51°C: 30 S, 72°C: 45 S), 72°C: 7 min
<i>csgA</i>	F: 5'-GGCAGGTGTTGTTCTCAGT-3' R: 5'-TCAGATCGATTGAGCTGTCA-3'	۲۰۰	
<i>csgD</i>	F: 5'-CGATGAGTAAGGAGGGCTGA-3' R: 5'-CCTCATATCAACGGCGTTT-3'	۱۵۳	94°C: 5 min, 35 cycles (94°C: 30 S, 57°C: 30 S, 72°C: 45 S), 72°C: 7 min
<i>yedQ</i>	F: 5'-TTTTCGCGAGACAGGAGATT-3' R: 5'-AACCGAGTTCGAACAGCATC-3'	۱۰۶	
<i>bcsA</i>	F: 5'-TTGATGGTAACGTCCACGAA-3' R: 5'-CGTATTCGCGCAGAACATAA-3'	۱۶۶	

اورپاتوژنیک از ترکیب سدیم نیتروپروساید، به‌عنوان یک ترکیب آزادکننده اکسید نیتریک، با غلظت‌های ۳۰ میکرومولار و ۱۲۵ نانومولار و آزمون کمی میکروتیتر پلیت استفاده گردید.^{۱۲} جهت انجام این تست از میان سویه‌های مولد بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف، چهار سویه انتخاب شدند و پس از تهیه کشت تازه از هر سویه باکتریایی، غلظت یک صدم از هر سویه در محیط آبگوشت لوریا برتانی بدون نمک تهیه گردید.

سپس ۱۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروساید به ۹۹۰ میکرولیتر از کشت باکتری اضافه و به خوبی مخلوط گردید و در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر از این مخلوط در چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ خانه تلقیح گردید.

پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، شست‌وشو و رنگ‌آمیزی به روشی که پیشتر در قسمت بررسی تشکیل بیوفیلم به روش کمی اشاره شد انجام گرفت و جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر بررسی شد.^{۱۳} در این آزمون از چاهک‌های محتوی محیط لوریا برتانی بدون نمک و ۱۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروساید به‌عنوان کنترل منفی (ODnc)، از چاهک‌های واجد سوسپانسون باکتریایی و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به‌عنوان کنترل مثبت (ODc)، استفاده گردید. همچنین، چاهک‌های حاوی باکتری تیمار شده با اکسید نیتریک به‌عنوان ODt و چاهک‌های محتوی محیط آبگوشت لوریا برتانی بدون نمک نیز به‌عنوان بلانک (ODs) در نظر گرفته شدند و هر تست با سه مرتبه تکرار انجام گرفت. در نهایت جهت بررسی اثر اکسید نیتریک بر مهار تشکیل بیوفیلم از فرمول زیر استفاده گردید.^{۱۴}

$$100 \times \frac{[ODc - ODs] - [ODt - ODnc]}{[ODc - ODs]}$$

پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، محتویات چاهک‌ها تخلیه و سه مرتبه شست‌وشو با فسفات بافر سالین انجام گرفت. سپس هر چاهک با کریستال یوله ۰/۰۳۳/ (Sigma-Aldrich, GmbH, Germany) به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شد و پس از تخلیه محتویات چاهک‌ها و شست‌وشو با آب مقطر، فرایند رنگبری با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر ترکیب اتانول-استن (۸۰-۲۰) انجام شد.

در نهایت، پس از قرائت جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر سویه‌ها به چهار دسته بیوفیلم قوی (4ODnc<ODs)، بیوفیلم متوسط (2ODnc<ODs<4ODnc)، بیوفیلم ضعیف (ODnc<ODs<2ODnc) و بیوفیلم منفی (ODs<ODnc)، تقسیم‌بندی شدند.

هر آزمایش سه بار تکرار شد و چاهک‌های فاقد باکتری به‌عنوان کنترل منفی (ODnc) در نظر گرفته شدند.

تعیین وجود ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلم، برای بررسی حضور ژن‌های مختلف مرتبط با تشکیل کورلای و سلولز در میان سویه‌های /شرشیا کلای واجد مورفوتایپ‌های rdar, bdar, pdar, از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *csgD*, *csgA* و *yedQ* (جدول ۱) براساس دستورالعمل پیشین Rahimi و همکاران استفاده گردید.^{۱۱} همچنین، در این مطالعه از سویه /شرشیا کلای شماره ۱۲ که پیشتر در انستیتو کارولینسکا سوئد به‌عنوان سویه بیوفیلم مثبت مولد کورلای و سلولز جداسازی و گزارش شده است، به‌عنوان کنترل مثبت برای این ژن‌ها استفاده گردید.^{۱۱}

بررسی اثر اکسید نیتریک بر تشکیل بیوفیلم، به‌منظور بررسی اثر اکسید نیتریک بر تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های /شرشیا کلای

نتایج حاصل از بررسی کمی توانایی تولید بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت توسط ۱۳۰۹ سویه اشرشیا کلای که در آزمون کیفی به عنوان بیوفیلم مثبت انتخاب شده بودند، نشان داد که تمامی سویه ها (۱۰۰٪) قادر به تولید بیوفیلم بودند. بدین ترتیب که ۶۷۹ سویه (۵۲٪) مولد بیوفیلم قوی، ۴۰۲ سویه (۳۱٪) قادر به تولید بیوفیلم متوسط و ۲۲۸ سویه (۱۷٪) نیز مولد بیوفیلم ضعیف بودند. در مجموع، از ۱۳۰۹ سویه اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک بیوفیلم مثبت مورد مطالعه، ۷۹۷ سویه (۶۱٪) و ۵۱۲ سویه (۳۹٪) به ترتیب از نمونه های زن و مرد جداسازی شدند ($P < 0.001$).

همچنین، مورفوتایپ های rdar و pdar در میان نمونه های زنان و مورفوتایپ bdar در میان نمونه های مردان از فراوانی بالاتری برخوردار بودند.

از طرف دیگر، فراوانی سویه های مولد بیوفیلم قوی و ضعیف در میان سویه های جداسازی شده از نمونه های زنان و فراوانی سویه های بیوفیلم متوسط در میان سویه های جداسازی شده از نمونه های مردان از فراوانی بالاتری برخوردار بودند، که این اختلافات معنادار نبودند. همچنین، بیشترین فراوانی سویه های مولد بیوفیلم در مردان و زنان متعلق به بازه سنی ۷۰-۶۱ سال و به ترتیب برابر با ۳۳/۶٪ و ۲۹/۵٪ بود (جدول ۲).

بررسی حضور ژن های مرتبط با تشکیل بیوفیلم در میان سویه های اشرشیا کلای مولد بیوفیلم، به دنبال انجام آزمون PCR جهت تعیین وجود ژن های مرتبط با تشکیل کورلای و سلول شامل *csaA*، *csaG*، *csaD* و *csaE* در میان سویه های اشرشیا کلای مولد بیوفیلم، حضور ژن *yedQ* در تمامی سویه ها (۱۰۰٪) به اثبات رسید. همچنین، فراوانی ژن های *csaA* و *csaD*، *csaG* نیز محدود به ۸۷٪ ($n=1139$)، ۹۸٪ ($n=1283$) و ۷۹٪ ($n=1034$) سویه ها بود.

از طرف دیگر، در مورفوتایپ rdar فراوانی تمامی ژن های مورد بررسی ۱۰۰٪ بود، در حالی که فراوانی ژن های *csaA*، *csaD*، *csaG* و *csaE* در مورفوتایپ bdar به ترتیب ۱۰۰٪، ۱۰۰٪، ۱۰۰٪ و ۷۹٪ و در مورفوتایپ pdar نیز به ترتیب ۳۸٪، ۹۱٪، ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ بود (جدول ۳). در جدول ۴ فراوانی ژن های مختلف در میان سویه های مولد بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف نشان داده شده که بر این اساس، فراوانی هر چهار ژن مورد مطالعه در سویه های مولد بیوفیلم قوی ۱۰۰٪ بود.

بررسی اثر اکسید نیتریک بر تخریب بیوفیلم، جهت تعیین اثر غلظت های مختلف سدیم نیتروپروساید بر بیوفیلم تشکیل شده، در ابتدا در داخل هر چاهک بیوفیلم توسط سویه های مورد بررسی، بر اساس روش مذکور در قسمت سنجش کمی تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت، تشکیل شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از دو غلظت ۳۰ میکرومولار و ۱۲۵ نانومولار سدیم نیتروپروساید به هر چاهک اضافه و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، محتویات هر چاهک به روش مطرح شده در قسمت پیش تخلیه و سپس شست و شو و رنگ آمیزی انجام شد.^{۱۲}

در نهایت پس از خوانش جذب نوری چاهک ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر، اثر تخریبی هر ترکیب بر بیوفیلم تشکیل شده بر اساس فرمول زیر محاسبه شد.^{۱۴}

درصد تخریب بیوفیلم مساوی (میانگین جذب نوری چاهک های بیمار شده/ میانگین جذب نوری چاهک های کنترل مثبت) $\times 100$ تجزیه و تحلیل داده های آماری، در این مطالعه جهت رسم تمامی نمودارها و همچنین انجام آنالیز آماری از نرم افزار GraphPad Prism و Fisher's exact test استفاده گردید.

یافته ها

شناسایی سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک، نتایج حاصل از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *tufa* نشان داد که تمامی ۳۸۱۴ ایزوله مشکوک جمع آوری شده از آزمایشگاه پاتوبیولوژی انتخابی با داشتن باند ۲۰۰ جفت بازی از نظر حضور ژن مورد نظر مثبت بودند و به عنوان سویه های اشرشیا کلای مورد شناسایی و تایید قرار گرفتند.

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم در میان سویه های اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک، بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو مشخص شد که از مجموع ۳۸۱۴ سویه اشرشیا کلای اوروپاتوژنیک مورد بررسی، ۱۳۰۹ سویه (۳۴٪) قادر به تولید همزمان یا جداگانه کورلای و سلولز بودند و به عنوان سویه های بیوفیلم مثبت، انتخاب شدند.

بر این اساس، ۶۸۲ (۵۲٪)، ۳۵۳ (۲۷٪) و ۲۷۴ (۲۱٪) سویه به ترتیب واجد کلنی های rdar، pdar و bdar بودند.

جدول ۲: فراوانی سویه‌های بیوفیلیم مثبت در نمونه‌های ادراری جداسازی شده از نمونه‌های مردان و زنان براساس سن

سن	جنس		P	
	مرد (درصد)	زن (درصد)		تعداد (درصد)
۲۰-۱۱	۷٪(۱/۴)	۱۹٪(۲/۴)	۱/۰۰۰۰	۲۶٪(۲)
۳۰-۲۱	۱۸٪(۳/۵)	۴۵٪(۵/۶)	۰/۷۴۷۵	۶۳٪(۴/۸)
۴۰-۳۱	۷۴٪(۱۴/۵)	۱۰۳٪(۱۲/۹)	۰/۸۳۸۹	۱۷۷٪(۱۳/۵)
۵۰-۴۱	۹۵٪(۱۸/۵)	۱۵۸٪(۱۹/۸)	۱/۰۰۰۰	۲۵۳٪(۱۹/۳)
۶۰-۵۱	۱۳۱٪(۲۵/۶)	۱۹۵٪(۲۴/۵)	۱/۰۰۰۰	۳۲۶٪(۲۴/۹)
۷۰-۶۱	۱۷۲٪(۳۳/۶)	۲۳۵٪(۲۹/۵)	۰/۶۴۹۵	۴۰۷٪(۳۱/۱)
۸۰-۷۱	۱۵٪(۲/۹)	۴۲٪(۵/۳)	۰/۷۲۰۹	۵۷٪(۴/۴)
تعداد (درصد)	۵۱۲٪(۳۹)	۷۹۷٪(۶۱)	<۰/۰۰۰۱	۱۳۰۹

Fisher's exact test: statistically significant (P < 0.05)

جدول ۳: فراوانی ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلیم در میان سویه‌های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلیم واجد مورفوتایپ‌های مختلف.

مورفوتایپ	ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلیم				تعداد (درصد)
	<i>bcsA</i>	<i>yedQ</i>	<i>csgD</i>	<i>csgA</i>	
rdar	۶۸۲٪(۱۰۰)	۶۸۲٪(۱۰۰)	۶۸۲٪(۱۰۰)	۶۸۲٪(۱۰۰)	۶۸۲٪(۵۲)
bdar	۳۵۳٪(۱۰۰)	۳۵۳٪(۱۰۰)	۳۵۳٪(۱۰۰)	۳۵۳٪(۱۰۰)	۳۵۳٪(۲۷)
pdar	۱۰۴٪(۳۸)	۲۴۸٪(۹۱)	۲۴۸٪(۹۱)	۲۴۸٪(۹۱)	۲۷۴٪(۲۱)

جدول ۴: فراوانی ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلیم در میان سویه‌های *اشرشیا کلای* مولد بیوفیلیم قوی، متوسط و ضعیف

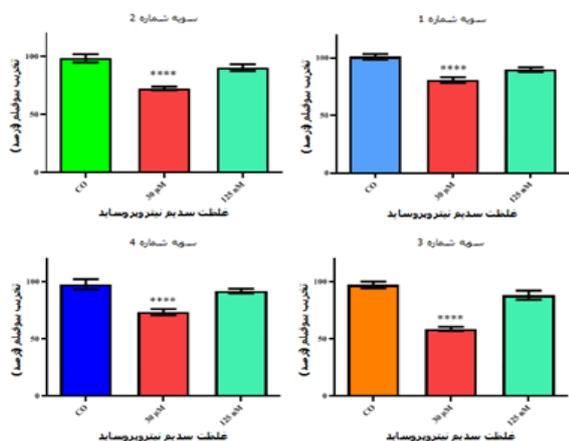
تولید بیوفیلیم	ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلیم				تعداد (درصد)
	<i>bcsA</i>	<i>yedQ</i>	<i>csgD</i>	<i>csgA</i>	
قوی	۶۸۲٪(۱۰۰)	۶۷۹٪(۱۰۰)	۶۷۹٪(۱۰۰)	۶۸۲٪(۱۰۰)	۶۷۹٪(۵۲)
متوسط	۳۲۸٪(۸۲)	۴۰۲٪(۱۰۰)	۴۰۲٪(۱۰۰)	۳۲۸٪(۸۲)	۴۰۲٪(۳۱)
ضعیف	۱۲۹٪(۵۷)	۲۲۸٪(۱۰۰)	۲۰۲٪(۸۹)	۱۲۹٪(۵۷)	۲۲۸٪(۱۷)

قرار گرفتند. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که غلظت ۳۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید قادر به کاهش معنادار تشکیل بیوفیلیم در هر چهار سویه مولد بیوفیلیم قوی، متوسط و ضعیف بود (شکل ۱). در مقابل، کاهش تشکیل بیوفیلیم در حضور غلظت ۱۲۵ نانومولار سدیم نیتروپروساید چندان قابل توجه نبوده و اختلاف

بررسی اثر اکسید نیتریک بر تشکیل بیوفیلیم، در این مطالعه، چهار سویه مولد بیوفیلیم شامل دو سویه مولد بیوفیلیم قوی (سویه‌های شماره ۱ و ۲)، یک سویه مولد بیوفیلیم متوسط (سویه شماره ۴) و یک سویه مولد بیوفیلیم ضعیف (سویه شماره ۳) در معرض دو غلظت بالا (۳۰ میکرومولار) و پایین (۱۲۵ نانومولار) سدیم نیتروپروساید

بررسی اثر اکسید نیتریک بر تخریب بیوفیلم، نتایج حاصل از بررسی غلظت‌های بالا و پایین سدیم نیتروپروساید بر تخریب و جدا شدن بیوفیلم تشکیل شده توسط چهار سویه مورد مطالعه تا حدودی منطبق بر نتایج آزمون بررسی اثر مهاري سدیم نیتروپروساید بر تشکیل بیوفیلم بود (شکل ۳).

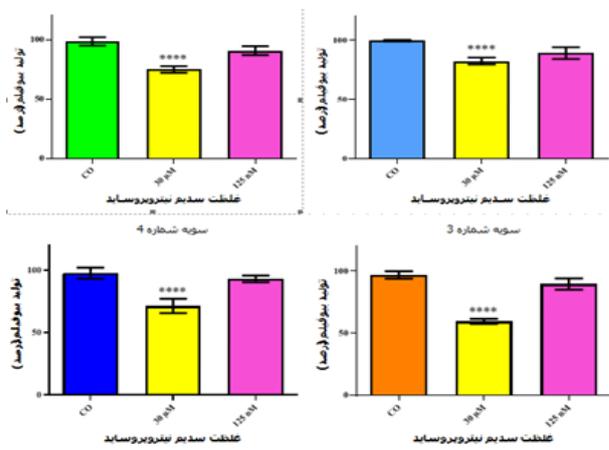
براین اساس مشخص شد که غلظت ۱۲۵ نانومولار سدیم نیتروپروساید تاثیر مخربی بر بیوفیلم تشکیل شده توسط هر چهار سویه ندارد (۷٪-۲).



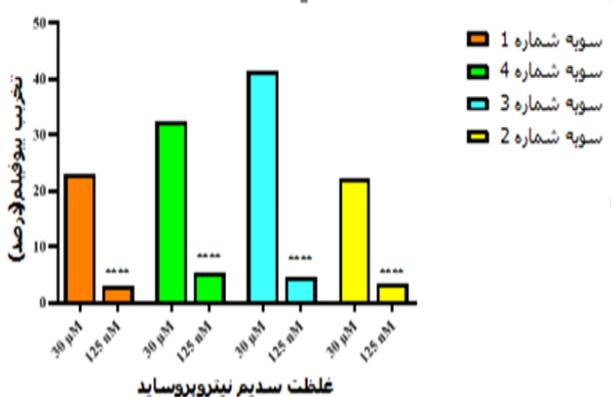
شکل ۳: بررسی اثر غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروساید بر تخریب بیوفیلم در سویه‌های مولد بیوفیلم قوی (۱ و ۲)، متوسط (۳) و ضعیف (۴).

معناداری نیز با سویه‌های کنترل نداشت. همچنین، بررسی فعالیت ضدبیوفیلمی سدیم نیتروپروساید نشان داد که غلظت ۳۰ میکرومولار این ترکیب تاثیر قابل توجهی در مهار تشکیل بیوفیلم نسبت به غلظت ۱۲۵ نانومولار داشته، به طوری که در حضور غلظت بالای این ترکیب، تشکیل بیوفیلم در چهار سویه مختلف به میزان ۴۰٪-۱۷ کاهش یافت.

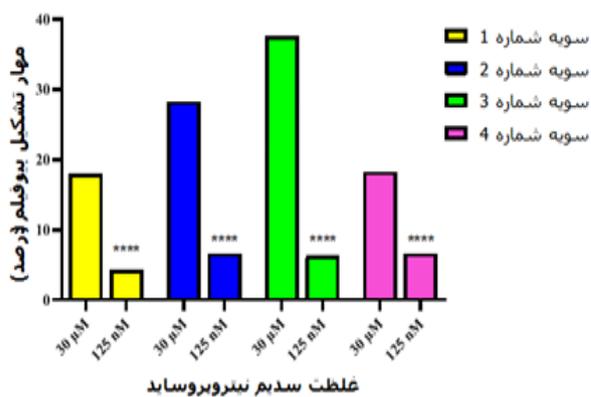
این درحالی است که تشکیل بیوفیلم در اثر تیمار با غلظت ۱۲۵ نانومولار سدیم نیتروپروساید، فقط ۹٪-۳ کاهش نشان داد (شکل ۲).



شکل ۲: بررسی اثر غلظت‌های مختلف سدیم نیتروپروساید بر تشکیل بیوفیلم در سویه‌های مولد بیوفیلم قوی (۱ و ۲)، متوسط (۳) و ضعیف (۴).



شکل ۴: درصد تخریب تشکیل بیوفیلم در سویه‌های مولد بیوفیلم قوی (۱ و ۲)، متوسط (۳) و ضعیف (۴) در حضور غلظت ۳۰ میکرومولار و ۱۲۵ نانومولار سدیم نیتروپروساید.



شکل ۵: درصد مهار تشکیل بیوفیلم در سویه‌های مولد بیوفیلم قوی (۱ و ۲)، متوسط (۳) و ضعیف (۴) در حضور غلظت ۳۰ میکرومولار و ۱۲۵ نانومولار سدیم نیتروپروساید.

بیوفیلیم توسط باکتری بسیار قویتر صورت می‌گیرد.^{۲۱} علاوه بر این، تمامی سویه‌های مولد کورلای و سلولز (مورفوتایپ rdar)، به استثناء سه سویه قادر به تشکیل بیوفیلیم قوی، و تمامی سویه‌های سلولز منفی و کورلای مثبت (مورفوتایپ bda)، سه سویه با مورفوتایپ rdar و ۴۶ سویه واجد مورفوتایپ pdar نیز، قادر به تشکیل بیوفیلیم متوسط بودند.

نتایج مطالعه نشان دهنده اهمیت تولید همزمان کورلای و سلولز برای تولید بیوفیلیم قوی توسط سویه‌های *اشرشیا کلای* اورپاتوژنیک است البته، باتوجه به اینکه سه سویه مولد کورلای و سلولز قادر به تشکیل بیوفیلیم قوی نبودند، می‌توان اینگونه اذعان داشت که علیرغم اهمیت بالای تولید همزمان کورلای و سلولز در تشکیل بیوفیلیم قوی، شدت تولید بیوفیلیم وابسته به میزان بیان و تولید این اجزا می‌باشد.

اکسید نیتریک یک مولکول گازی درون زا (Endogenous) بوده که توسط ماکروفاژهای بدن تولید می‌گردد. اثرات ضد میکروبی این ماده بر حسب غلظت آن متفاوت می‌باشد بطوری که در غلظت‌های پایین، به‌عنوان یک مولکول سیگنال‌دهنده سبب رشد و فعالیت سلول‌های ایمنی شده و در غلظت‌های بالا، به‌عنوان مثال هنگام فرایند انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها، با اتصال کووالانسی به DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها موجب مهار و یا از بین بردن پاتوژن‌های هدف می‌گردد.^{۲۲} به‌علاوه در باکتری‌ها، اکسید نیتریک از طریق اثر بر آنزیم گوانیلات سیکلاز که خود در کنترل میزان تولید پیام آور ثانویه di-GMP cyclic نقش دارد، در تعدیل تولید بیوفیلیم مشارکت می‌نماید.^{۲۳}

باتوجه به اثر ضد بیوفیلیمی غلظت بالای اکسید نیتریک بر شکل بیوفیلیم و همچنین تخریب بیوفیلیم تشکیل شده در این مطالعه، به نظر می‌رسد که این ترکیب احتمالاً عملکرد خود را با تاثیر بر کاهش تولید کورلای و سلولز از طریق هدف قرار دادن ژن‌های مربوطه *csGA*، *yedQ* و *bcsA* نشان می‌دهد. پروتئین CsgD به‌عنوان تنظیم‌کننده مثبت در مسیر سنتز کورلای و سلولز شناخته می‌شود که می‌تواند مستقیماً بیان ژن‌های *csGA* و *bcsA* را تحت تاثیر قرار دهد.^{۱۰} در این مطالعه، تمامی سویه‌ها واجد ژن *yedQ* بودند.

پروتئین YedQ که به‌عنوان یکی از انواع دی گوانیلات سیکلازها شناخته می‌شود، می‌تواند به‌صورت مستقل از پروتئین CsgD در تولید بیوفیلیم ایفای نقش کند. اما در هر صورت، CsgD به‌عنوان تنظیم‌کننده اصلی و هدف سیگنالینگ c-di-GMP در *اشرشیا کلای* و سایر

در مقابل غلظت ۳۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید باعث تخریب ۴۵٪-۲۰ بیوفیلیم تشکیل شده توسط سویه‌های مختلف می‌گردد (شکل ۴). به‌طور کلی اثر تخریبی غلظت بالای نیتروپروساید بر بیوفیلیم ناشی از سویه‌های مولد بیوفیلیم ضعیف بالاتر از سویه‌های مولد بیوفیلیم متوسط و قوی بود.

بحث

در مطالعه حاضر ۶۵٪ عفونت‌های ادراری در میان بیماران سرپایی مراجعه‌کننده به آزمایشگاه پاتوبیولوژی مورد نظر در شهر تهران ناشی از سویه‌های *اشرشیا کلای* بود که این یافته منطبق بر سایر مطالعات انجام گرفته است که در آنها *اشرشیا کلای* به‌عنوان باکتری غالب و شایعترین عامل ایجاد عفونت ادراری معرفی شده است.^{۹،۳} همچنین، فراوانی سویه‌های *اشرشیا کلای* اورپاتوژنیک در این مطالعه در میان زنان به‌صورت معناداری بیشتر از مردان بود که مشابه با یافته‌های حاصل از تحقیقات پیشین می‌باشد.^{۱۵،۱۰،۹} به‌طور کلی شیوع بالاتر عفونت ادراری در میان زنان می‌تواند ناشی از ویژگی‌های آناتومیکی و فیزیولوژیکی آنها نظیر کوتاهاتر بودن مجرای ادراری و نزدیک بودن آن به مخرج، باشد.^{۱۶}

در این مطالعه، تمامی ۱۳۰۹ سویه که در آزمون کیفی به‌عنوان سویه‌های مولد کورلای و/یا سلولز شناسایی شده بودند، در آزمون کمی نیز به‌عنوان بیوفیلیم مثبت مورد تایید قرار گرفتند، بنابراین نتایج هر دو آزمون سنجش بیوفیلیم بر هم منطبق بودند. در این میان، ۸۳٪ سویه‌ها در دسته بیوفیلیم قوی و متوسط قرار گرفتند که موید نقش و اهمیت بیوفیلیم در بیماریزایی این باکتری می‌باشد.^{۱۷،۵} تاکنون گزارش‌های مختلفی از فراوانی سویه‌های بیوفیلیم مثبت در ایران و سایر کشورها ارایه شده است.^{۱۸-۲۰} تفاوت در فراوانی ایزوله‌های بیوفیلیم مثبت در مطالعات مختلف می‌تواند ناشی از تفاوت در شرایط بالینی بیماران مراجعه‌کننده (سرپایی یا بستری)، نوع نمونه‌ها، وجود یا عدم وجود سوند ادراری، وضعیت بهداشتی و فرهنگی شهرهای مورد مطالعه و بازه زمانی نمونه‌گیری باشد.

همچنین، از مهمترین عوامل موثر مدت زمان استفاده از سوندهای ادراری می‌باشد. در بیمارانی که به‌دلایل آسیب‌های نخاعی به مدت طولانی و گاه مادام‌العمر از سوند ادراری استفاده می‌کنند، تشکیل

به توسعه استراتژی‌های جدید برای مبارزه با عفونت‌های مرتبط با بیوفیلم کمک می‌کند. براین اساس به نظر می‌رسد که باتوجه به حضور ژن *yedQ* در تمامی سویه‌های مولد بیوفیلم، کاهش بیوفیلم ناشی از غلظت بالای اکسید نیتریک احتمالا از طریق پروتیین YedQ میانجیگری می‌گردد، که بیان ژن *csgD* و متعاقبا تولید کورلای و سلولز را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی مرتبط با پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی تاثیر عصاره گیاهی گل نیمریز و گل پنج انگشتی بر تشکیل بیوفیلم در میان جدایه‌های *اشرشیا کلای* مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری" در سال ۱۴۰۳ و کد IR.UI.REC.1403.155 می‌باشد که با حمایت دانشگاه اصفهان اجرا شده است.

اعضای خانواده *اثریوباکتریاسه* شناخته شده که به صورت غیرمستقیم باعث افزایش بیان ژن *bcsA* و نهایتا تولید سلولز می‌شود.^{۲۴} علیرغم شناسایی یک مسیر جایگزین و مستقل از *CsgD* جهت تولید سلولز در *اشرشیا کلای*، همچنان مطالعات نشان می‌دهند که میزان تولید سلولز در سویه‌های فاقد ژن *csgD* کمتر از سویه‌های واجد این ژن می‌باشد.^{۲۶،۲۵}

نتیجه‌گیری، براساس نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان اذعان داشت که تولید همزمان کورلای و سلولز برای تولید بیوفیلم قوی توسط سویه‌های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک بسیار ضروری و حائز اهمیت می‌باشد. همچنین، یافته‌های این مطالعه موید فعالیت ضدبیوفیلمی غلظت بالای اکسید نیتریک بر سویه‌های *اشرشیا کلای* اوروپاتوژنیک مولد کورلای و سلولز می‌باشد، که این نتایج می‌تواند

References

- Tandogdu Z, Wagenlehner FM. Global epidemiology of urinary tract infections. *Current opinion in Infectious Diseases* 2016;29(1):73-9.
- Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology* 2015;13(5):269-84.
- Zhou Y, Zhou Z, Zheng L, Gong Z, Li Y, Jin Y, et al. Urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli*: mechanisms of infection and treatment options. *International Journal of Molecular Sciences* 2023;24(13):10537.
- Soto S, Smithson A, Martinez J, Horcajada J, Mensa J, Vila J. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. *Journal of Urology* 2007;177(1):365-8.
- Abe K, Nomura N, Suzuki S. Biofilms: hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. *FEMS Microbiology Ecology* 2020;96(5):1-12.
- Svensson L, Poljakovic M, Demirel I, Sahlberg C, Persson K. Host-derived nitric oxide and its antibacterial effects in the urinary tract. *Advances in Microbial Physiology* 2018;73:1-62.
- Vumma R, Bang CS, Kruse R, Johansson K, Persson K. Antibacterial effects of nitric oxide on uropathogenic *Escherichia coli* during bladder epithelial cell colonization-a comparison with nitrofurantoin. *Journal of Antibiotics* 2016;69(3):183-6.
- Rahimkhani M, Mordadi A, Kazemian K, Khalili H. Comparison of *Helicobacter pylori* Detection Methods: It's Association with Leukocytosis and Monocytosis. *Infectious Disorders-Drug Targets* 2020;20(6):920-4.
- Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Clonal groups of extended-spectrum β -lactamase and biofilm producing uropathogenic *Escherichia coli* in Iran. *Pathogens and Global Health* 2022;116(8):485-97.
- Rahimi F, Mehmandoost J. Biofilm and curli formation among *Escherichia coli* strains isolated from urinary infections in Tehran, 2016. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine* 2018;23(81):9-15.
- Kai-Larsen Y, Lütjhe P, Chromek M, Peters V, Wang X, Holm Å, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial peptide LL-37. *PLoS Pathogens* 2010;6(7):e1001010.
- Cimdins A, Simm R, Li F, Lütjhe P, Thorell K, Sjöling Å, et al. Alterations of c-di-GMP turnover proteins modulate semi-constitutive rdar biofilm formation in commensal and uropathogenic *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen* 2017;6(5):e00508.
- Yin W, Wang Y, Liu L, He J. Biofilms: the microbial "protective clothing" in extreme environments. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20(14):3423.
- O'Toole G. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments* 2011; 30(47):2437.
- Qasemi A, Rahimi F, Katouli M. Genetic diversity and virulence characteristics of biofilm-producing uropathogenic *Escherichia coli*. *International Microbiology* 2022;25(2):297-307.
- Fu Z, Liska D, Talan D, Chung M. Cranberry reduces the risk of urinary tract infection recurrence in otherwise healthy women: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Nutrition* 2017; 147(12):2282-8.
- Shahbazi S, Karam MRA, Habibi M, Talebi A, Bouzari S. Distribution of extended-spectrum β -lactam, quinolone and carbapenem resistance genes, and genetic diversity among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Tehran, Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2018;14:118-25.
- Ramírez Castillo FY, Guerrero Barrera AL, Harel J, Avelar González FJ, Voegelé P, Arreola Guerra JM, et al. Biofilm formation by *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections from Aguascalientes, Mexico. *Microorganisms* 2023;11(12):2858.
- Nikzad M, Mirnejad R, Babapour E. Evaluation of antibiotic resistance and biofilm formation ability uropathogenic *E. coli* (UPEC) Isolated from pregnant women in Karaj. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 2021;15(2):195-211.
- Katongole P, Nalubega F, Florence NC, Asiimwe B, Andia I. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility and virulence genes of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from clinical isolates in Uganda. *BMC Infectious Diseases* 2020;20:1-6.
- Rahimkhani M. Urinary tract infection in spinal cord injuries. Congress on Quality Improvement in Clinical Laboratories (9th)

- International & 14 National Congress) 2016.
22. Anantharaman S, Guercio D, Mendoza AG, Withorn JM, Boon EM. Negative regulation of biofilm formation by nitric oxide sensing proteins. *Biochemical Society Transactions* 2023;51(4):1447-58.
 23. Yang L, Zheng C, Chen Y, Shi X, Ying Z, Ying H. Nitric oxide increases biofilm formation in *Saccharomyces cerevisiae* by activating the transcriptional factor Mac1p and thereby regulating the transmembrane protein Ctr1. *Biotechnology for Biofuels* 2019;12:1-15.
 24. Yan C-H, Chen F-H, Yang Y-L, Zhan Y-F, Herman RA, Gong L-C, et al. The transcription factor CsgD contributes to engineered *Escherichia coli* resistance by regulating biofilm formation and stress responses. *International Journal of Molecular Sciences* 2023;24(18):13681.
 25. Da Re S, Ghigo J-M. A CsgD-independent pathway for cellulose production and biofilm formation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 2006;188(8):3073-87.
 26. García B, Latasa C, Solano C, Portillo FGd, Gamazo C, Lasa I. Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Molecular Microbiology* 2004;54(1):264-77.

Investigation the effect of nitric oxide on biofilm-producing uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients

Fateh Rahimi Ph.D.^{1*}
Sanaz Khashei Ph.D Student.²

1- Department of Microbiology,
Faculty of Biological Science and
Technology, University of Isfahan,
Isfahan, Iran.

2- Department of Microbiology,
Faculty of Medicine, Isfahan
University of Medical Sciences,
Isfahan, Iran.

Abstract

Received: 15 Aug. 2024 Revised: 21 Aug. 2024 Accepted: 14 Sep. 2024 Available online: 22 Sep. 2024

Background: Biofilm producing uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains are of major concern in clinical settings which display increased resistance to conventional antimicrobial therapy. Nitric oxide (NO) has shown to exhibit anti-biofilm effects in a variety of bacterial species. In this study we aimed to evaluate the effectiveness of NO on the formation and eradication of biofilm of UPEC strains isolated from patients with urinary infection (UI) in Tehran.

Methods: During May 2022 to April 2023, a total of 3814 suspected isolates of UPEC were collected from a pathobiology laboratory in Tehran and confirmed as *E. coli* strains using specific primers for elongation factor Tu (*tufA*) gene. All strains were screened for the ability to form biofilm by the microtiter plate (MTP) and Congo red agar (CRA) assays, and also the presence of biofilm genes were detected among biofilm producing strains. Moreover, the effect of NO on biofilm formation and its dispersal was evaluated by the high (30 mM) and low (125 nM) concentrations of sodium nitroprusside (SNP) as NO donor.

Results: All collected isolates were confirmed by the polymerase chain reaction (PCR) using specific primers, in which 1309 strains (34%) were able to form colonies with red, dry and rough (rdar, curli and cellulose positive) (n=682, 52%), brown, dry and rough (bdar, curli positive and cellulose negative) (n=353, 27%) and pink, dry and rough (pdar, cellulose positive and curli negative) (n=274, 21%) morphotypes on CRA and selected as biofilm positive strains. Furthermore, 228 (17%), 402 (31%) and 679 (52%) strains were able to form a weak, moderate, and strong biofilm, respectively, and *csgA*, *csgD*, *yedQ*, and *bcsA* genes were found among 87, 98, 100 and 79% of biofilm-positive strains, respectively. The 30 mM concentration of SNP significantly decreased the biofilm formation (17-40%) and increased biofilm dispersal (20-45%) among UPEC strains.

Conclusion: These findings confirmed the applicability of nitric oxide as an anti-biofilm agent for UPEC strains. These findings contribute to the development of novel strategies for fighting biofilm-associated infections.

Keywords: biofilms, nitric oxide, urinary infection, uropathogenic *Escherichia coli*.

* Corresponding author: Department of Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Hezarjarib Street, Isfahan, Iran. Tel: +98-31-37932471 E-mail: f.rahimi@sci.ui.ac.ir