

## مقاله تحقیقی

بررسی آب‌گریزی سطح سلولی و حضور ژنهای کدکننده فیمبریای کورلی در جدایه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن

سمیرا اسکندری<sup>۱</sup>، سحر هنرمند جهرمی<sup>۱\*</sup>، شهره زارع کاریزی<sup>۲</sup>

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

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

\* مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: sahar\_hj2@yahoo.com

محل انجام تحقیق: گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا

تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲۴

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۱۹

### چکیده

هیدروفوبیسیته سطح سلولی (CSH) از مهمترین فاکتورهایی است که چسبیدن باکتری به سطوح زیستی و غیر زیستی کنترل می‌کند. اتصال *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن به سلول میزبان و توانایی تهاجم گام مهمی در فرایند عفونت مجاری ادراری اد CSH تحت تاثیر مولکول‌ها و اجزای سطحی سلولی باکتری‌ها است. این مطالعه جهت ارزیابی CSH و حضور ژنهای کدکننده فیمبریای کورلی در جدایه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن انجام گرفت. ۱۰۰ جدایه *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن از نمونه بیماران مبتلا عفونت ادراری مراجعه‌کننده به بیمارستان میلاد تهران با انجام کشت و تست‌های افتراقی شناسایی و جداسازی شدند. CSH جدایه‌ها با روش‌های چسبندگی باکتری به هیدروکربن (MATH) و رسوب دهی نمک (SAT) مشخص شد. حضور ژن‌های کدکننده فیمبریای کورلی *csgA* و *csgD* با روش PCR مشخص شد. آنالیز آماری داده‌ها با SPSS نسخه ۲۰ و آزمون مربع کای از شد. با روش MATH، هیدروفوبیسیته سویه‌های *اشریشیا کلی* ۴۲ درصد قوی، ۳۸ درصد متوسط، ۲۰ درصد منفی تعیین شد. با روش SAT ۶۳ درصد دارای هیدروفوبیسیته قوی، ۲۵ درصد متوسط و ۱۲ درصد فاقد هیدروفوبیسیته بودند. بین دو روش از هیدروفوبیسیته اختلاف معناداری مشاهده نشد. فراوانی ژن‌های *csgD* و *csgA* به ترتیب ۳۰ درصد و ۳۵ درصد بود. فراوانی همزه دو ژن ۱۶ درصد بود. ارتباط معناداری بین فراوانی ژن‌ها و آب‌گریزی سطحی جدایه‌ها وجود نداشت. آب‌گریزی بالای *اشریشیا* یوروپاتوژن می‌تواند آغاز چسبندگی بین سلول‌ها و آغاز تشکیل بیوفیلم و به دنبال آن عفونت ادراری را تشدید کند. حضور ژن فیمبریای کورلی در جدایه‌های *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن به عنوان یکی از عوامل ویرولانسی این باکتری حائز اهمیت است که در خصوص بررسی بیان این ژنها و نقش آنها در تشکیل بیوفیلم UPEC باید مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن، آب‌گریزی سطحی سلولی، ژن‌های فیمبریای کورلی

## مقدمه

بیوفیلیم‌ها تجمعات میکروبی هستند که به یک سوسترا به عنوان سطح چسبیده و در یک ماتریکس اگزوپلی ساکاریدی احاطه می‌شوند (۲). مطالعات نشان داده که تقریباً ۶۵٪ عفونت‌های بالینی، مرتبط با تشکیل بیوفیلیم‌های میکروبی بر روی سطوح بافت‌ها، اندام‌ها یا ابزار پزشکی هستند (۳). از طرفی اغلب میکروارگانیسم‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلیم در برابر ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها به شدت مقاومت نشان می‌دهند و این امر تبدیل به یک نگرانی جدی در جامعه پزشکی شده که نه تنها باعث نقص درمان عفونت در بیماران می‌شود، بلکه از نظر سلامت جامعه نیز حائز اهمیت است (۴). چسبندگی باکتریایی اولین مرحله تشکیل بیوفیلیم است که به شرایط محیطی، خصوصیات سطح تماس و پلی‌مرهای خارج سلولی ترشح شده توسط باکتری‌ها بستگی دارد (۵،۶)، ولی به طور جدی توسط ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مانند برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک، واندروالس، هیدروفوبیک که تحت عنوان آب‌گریزی سطحی یا هیدروفوبیسیته سطح سلولی (CSH)، تعریف می‌شوند، مدیریت می‌گردد (۷). در واقع نقش اساسی در کلنیزاسیون باکتریایی بر روی مواد زنده و غیر زنده دارد (۷). از طرفی ابزارهای پزشکی مانند کاتترها، دریچه‌های قلب مصنوعی و یا ضربان‌سازهای مصنوعی همه از مواد هیدروفوبیک ساخته شده‌اند که باعث می‌شود میکروارگانیسم‌های هیدروفوبیک هم‌تمایل نسبی برای اتصال به چنین سطوحی داشته باشند. این میکروارگانیسم‌ها بسیار تهاجمی هستند و باعث ایجاد بیماری‌های می‌شوند که درمان آنها غالباً سخت است (۸). مطالعات قبلی نشان داده که مولکول‌هایی که در سطح سلول باکتریایی بیان می‌شوند همراه با هیدروفوبیسیته طی مرحله اتصال برگشت پذیر بر روی برهم‌کنش‌های فیزیکوشیمیایی بین باکتری‌ها و سوستراها تأثیر دارند (۹). با این حال برخی مطالعات هیچ ارتباطی پیدا نکردند (۱۰). اما این مسئله کاملاً مشهود است که اتصال اختصاصی باکتری‌ها به سوستراها از طریق مولکول‌های پلی‌مری سطح سلول باکتری مانند پیلی، فیمبریا، لیپوپلی ساکارید‌ها یا پلی‌ساکارید‌های کپسولی واسطه قرار

می‌گیرد (۱۱). سویه‌های اش‌رشیاکلی یوروپاتوژنیک<sup>۴</sup> (UPEC)، می‌توانند یک بیوفیلیم اختصاصی به صورت کمپلکسی از جمعیت باکتریایی درون سلولی<sup>۴</sup> (IBC) در بین سلول‌های چتری سطح مثانه تشکیل دهند که منجر به ایجاد عفونت مجاری ادراری<sup>۵</sup> (UTI) می‌شود (۱۲). زمانی که باکتری به صورت بیوفیلیم در غشاهای مخاطی مثانه کلنیزه می‌شود تمایل به بقاء طولانی مدت در بافت میزبان دارد. این ساختارهای مقاوم به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها غیرقابل نفوذ بوده و منجر به ایجاد مقاومت چندگانه دارویی باکتریایی شده و در نتیجه باعث عفونت مجاری ادراری غیرقابل درمان، سیستمیت مزمن و حتی پروستات می‌شوند (۱۲). آنالیز ژنتیکی نشان داده که ساختارهای سطحی مثل چسبنده‌های غشای خارجی پیلی و فیمبریای کورلی اش‌رشیاکلی (Curlin fimberia) برای تشکیل بیوفیلیم مهم هستند (۱۳). فیمبریای کورلی که در ابتدا در *E. coli* شناسایی شد، و فیمبریای تجمع‌کننده نازک نیز نامیده می‌شود، توسط دیگر انتروباکتریاسه‌ها مانند شیگلا، سیتروباکتر و انتروباکتر تولید می‌شود (۱۴). فیمبریای کورلی توسط اوپرون *csgABCD* و ژن‌های مهم *csgA* و *csgD* کد می‌شود (۱۳). این چسبنده‌ها به عنوان فاکتورهای بیماری‌زایی UPEC مهم هستند، زیرا باعث اتصال و کلنیزاسیون باکتری به بافت‌های میزبانی نیز می‌شوند. IDESES و همکاران نشان دادند که سویه‌های *E. coli* 0157:H7 تولیدکننده فیمبریای کورلی هیدروفوبیسیته بیشتری نسبت به سویه‌های فاقد فیمبریای کورلی داشته و اتصال قوی تری به بافت میزبانی دارند (۱۵). هدف از تحقیق حاضر بررسی هیدروفوبیسیته سطح سلولی سویه‌های اش‌رشیاکلی یوروپاتوژن جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری مراجعه‌کننده به بیمارستان میلاد تهران و حضور ژن‌های کدکننده فیمبریای کورلی در بین جدایه‌ها است.

## مواد و روش‌ها

## جمع‌آوری نمونه‌ها

<sup>4</sup> intracellular bacterial community

<sup>5</sup> Urinary tract infection

<sup>2</sup> cell surface hydrophobicity

<sup>3</sup> Uropathogenic *Escherichia coli*

قدرت آب گریزی یا هیدروفوبیسیته جدایه های اشیریشیا کلی یوروباتونن به صورت قوی، متوسط و منفی، آب دوستی یا هیدروفیل به ترتیب با درصد چسبندگی  $50\% >$ ،  $20-50\%$  و  $20\% >$  گزارش شد (۱۸).

### تعیین هیدروفوبیسیته سطح سلولی با روش روش رسوب دهی در نمک یا SAT

این روش بر اساس رسوب دهی سلولی در غلظت های مختلف آمونیوم سولفات با مولاریته های مختلف است. در این روش سوسپانسیون از کشت میکروبی در بافر فسفات (PBS, pH 6.8 تهیه شده و محلول های آمونیوم سولفات  $(NH_4)_2SO_4$ ) با مولاریته های ۰/۱ تا ۴ آماده می شود. سپس، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با حجم مساوی از محلول نمک مخلوط می شود. کمترین مولاریته آمونیوم سولفات که پس از ۴ دقیقه در آن رسوب یا Clump باکتریایی مشاهده شود به عنوان مقدار SAT در نظر گرفته می شود. قدرت هیدروفوبیسیته سلولی به صورت هیدروفوب قوی، هیدروفوب و هیدروفیل به ترتیب با غلظت های ۱.۰ مولار، ۲-۱ مولار و  $2 >$  مولار آمونیوم سولفات مشخص می شود (۱۹).

### تکثیر ژن های *csgA* و *csgD* با روش PCR

به منظور استخراج DNA همه جدایه های اشیریشیا کلی از کیت استخراج DNA باکتری گرم منفی شرکت سینا ژن استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت. به جهت تکثیر و بررسی فراوانی ژن های *csgD* و *csgA* از پرایمرهای اختصاصی با توالی های رفت و برگشتی ATTTGCAGCAATCGTATTCTCC و *csgA* ، GCCATCCTGAGTCACGTTGAC برای ژن *csgD* و پرایمرهای با توالی رفت و برگشتی TGATCACTAGATCTTCTTTCAGG و *csgD* ، GAACAACGAACGAGCGATCTC برای ژن *csgD* با اندازه ۵۰۰ جفت باز طراحی شده در این تحقیق استفاده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱X بافر PCR (۱۰×) (شرکت سیناکلون)، ۲ میلی مولار  $MgCl_2$ ، ۰/۳

این مطالعه مقطعی - توصیفی بر روی ایزوله های اشیریشیا کلی جدا شده از ۲۰۴ نمونه ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری که به مدت ۶ ماه در سال ۱۳۹۵ به بیمارستان میلاد تهران مراجعه کرده بودند، انجام شد. ادرار میانی بیماران در ظروف استریل جمع آوری شد. نمونه های ادراری حاوی باکتریوری (بیش از  $10^5$  CFU/ml) به عنوان عفونت ادراری در نظر گرفته شدند. نمونه های ادراری در پلیت های حاوی محیط مک کانکی آگار و EMB آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. شناسایی جدایه های اشیریشیا کلی بر اساس انجام تست های بیوشیمیایی مانند کشت در محیط TSI آگار، SIM ، سیمون سیتزات و محیط مایع MRVP (Merck, Germany) انجام گرفت.

### تعیین هیدروفوبیسیته سطح سلولی با روش MATH<sup>۶</sup>

یکی از روش های تعیین هیدروفوبیسیته سلول باکتریایی روش چسبندگی میکروبی به هیدروکربن های هیدروفوبیک مثل اکتان (n-octane) یا روش MATH است (۱۶). در این روش پس از کشت شبانه روزی از کلنی باکتری ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، برداشت شده و دو بار با محلول بافر فسفات (NaCl: 1.9 g, PBS: 7.6 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0.7 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O: per liter, pH7.2) که محلول هیدروفوب است، شستشو داده می شود و در همان محلول PBS سوسپانسیون باکتری تهیه شده و جذب آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده می شود که *A1* نامگذاری می گردد. سپس ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی و میلی لیتر از اکتان به مدت ۱۲۰ ثانیه با ورتکس مخلوط می شود و به مدت ۱ ساعت بدون تکان دادن گرمخانه گذاری می شوند تا دو محلول به صورت دو فاز مجزا مشخص شوند. جذب مایع هیدروفیلک پایینی دوباره در طول موج ۶۰۰ نانومتر اسپکتروفتومتر خوانده شده و *A2* نامگذاری می شود (۱۷). سپس، هیدروفوبیسیته سطح سلولی یا CSH به صورت درصد چسبندگی (*Adh%*) از رابطه زیر محاسبه می گردد:

$$\%Adh = [1 - (A2/A1)] \times 100$$

<sup>6</sup> Microbial adhesion to hydrocarbons

<sup>7</sup> Salt Aggregation Test

استفاده شد. سطح معنا داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### نتایج

از ۲۰۴ نمونه ادراری بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری پس از انجام تست های تشخیصی ۱۰۰ جدایه اشرب کلی یوروپاتوژن جدا سازی شد.

### نتایج تعیین هیدروفوبیسیت به روش MATH

پس از تشکیل دو فاز در محلول حاوی اکتان: سوسپانسیون میکروبی (شکل ۱)، و تعیین مقادیر جذب نو  $A1$  و  $A2$  و محاسبه  $Adh\%$ ، قدرت هیدروفوبیسیت به های اشربشیا کلی یوروپاتوژن به صورت ۴۲ درصد قوی، درصد متوسط و ۲۰ درصد فاقد قدرت هیدروفوبیس مشخص شد (نمودار ۱).

میلی مولار dNTP (شرکت سینا کلون)، ۱/۵ واحد آنزیم TagDNA polymerase (شرکت سینا کلون)، ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها و ۱۰۰ نانوگرم DNA باکتریایی انجام گرفت. برنامه دمایی و زمانی PCR شامل مرحله واسرشت اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، مرحله واسرشت ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵۵ ثانیه، مرحله اتصال ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۵۵ ثانیه، مرحله بسط ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه در ۳۲ سیکل و مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. جهت بررسی محصولات PCR نمونه ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد انتقال داده شده و بعد از رنگ آمیزی در دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفت.

### آنالیز آماری

جهت آنالیز آماری داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد. آزمون مربع کای ( $\chi^2$  test) برای بررسی ارتباط بین هیدروفوبیسیت سلولی با فراوانی ژنهای  $csgA$ ،  $csgD$



شکل ۱ - تشکیل دوفاز در محلول حاوی اکتان و سوسپانسیون میکروبی پس از ۱ ساعت.

سویه های بر حسب هیدروفوبیسیت به اختلاف معناداری و ندارد ( $P=0.2$ ) ( $P>0.05$ ).

### نتایج تکثیر ژن های کد کننده فیمبریای کورلی (A و csgD)

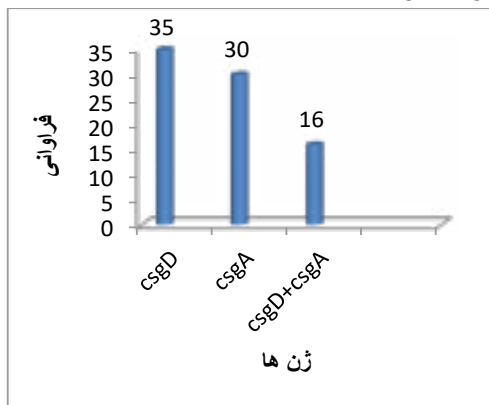
پس از تکثیر ژن های  $csgA$  و  $csgD$  برای همه س های اشربشیا کلی یوروپاتوژن، محصول PCR به سوباندهایی به اندازه ۴۰۰ جفت باز برای ژن  $csgA$  و ۵۰۰ جفت باز برای ژن  $csgD$  بر روی ژل آگاروز ۱ درصد مشاهده شد (شکل ۲).

### نتایج تعیین هیدروفوبیسیت به روش SAT

بر اساس نتایج به دست آمده از روش SAT، هیدروفوبیسیت سویه های اشربشیا کلی یوروپاتوژن به صورت ۵۸ درصد هیدروفوب قوی، ۳۰ درصد هیدروفوب و ۱۲ درصد هیدروفیل تعیین شد (نمودار ۱).

مقایسه دو روش تعیین هیدروفوبیسیت جدایه های اشربشیا کلی یوروپاتوژن نشان داد که ۳۹ درصد جدایه ها با هر دو روش دارای قدرت هیدروفوبیسیت قوی بودند. آنالیز آماری نشان داد که بین دو روش در تعیین درصد فراوانی

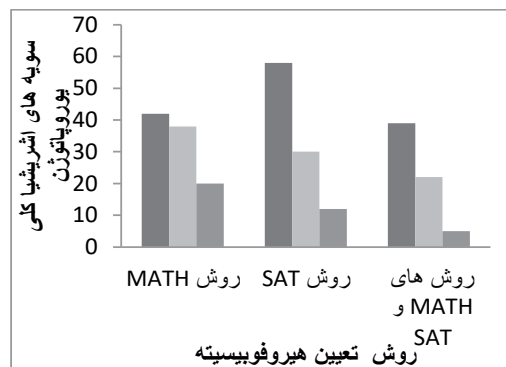
آماري اختلاف معنا داري بين فراواني ژن ها در جدايه هاي باكتري نشان نداد ( $P>0.05$ ).



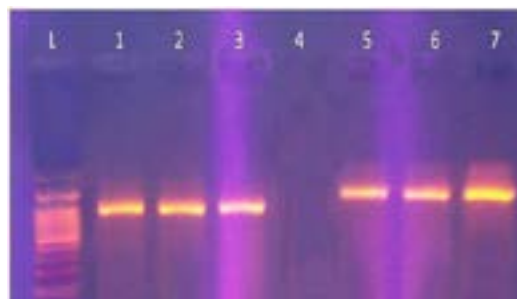
نمودار ۲ - فراواني ژنهای فيمبriاي کورلي در جدايه هاي اشريشيا کلي يوروپاتوژن.

### ارتباط فراواني ژنهای فيمبriاي کورلي با هيدروفوبيسيته به روش MATH

از بين ۴۲ جدايه اشريشيا کلي يوروپاتوژن داري هيدروفوبيسيته قوي، ۱۳ جدايه داري ژن *csgA* و ۱۹ جدايه ژن *csgD* را داشتند. از بين ۳۸ جدايه داري هيدروفوبيسيته متوسط ۱۰ جدايه ژن *csgA* و ۹ جدايه ژن *csgD* را داشتند. از ۲۰ جدايه هيدروفيل به ترتيب ۴ جدايه و ۷ جدايه داري ژن های *csgA* و *csgD* بودند (جدول ۱). فراواني همزمانی ژنها در جدايه های هيدروفوب قوي، متوسط و منفي یا هيدروفيل به ترتيب ۱۹ درصد، ۱۰/۵ درصد و ۱۵ درصد بود. بين فراواني ژنها و تركيب ژن ها با هيدروفوبيسيته جدايه ها ارتباط معنا داري مشاهده نشد ( $P>0.05$ ).



نمودار ۱ - تعيين قدرت هيدروفوبيسيته جدايه هاي اشريشيا کلي يوروپاتوژن به روش های MATH و SAT.



شکل ۲: تصوير الکتروفورز محصولات PCR ژنهای *csgA* و *csgD* جدايه های اشريشيا کلي يوروپاتوژن. سايز مارکر ۱۰۰ جفت بازي. چاهک شماره ۱ و ۲ مربوط به ژن *csgA* با اندازه ۴۰۰ جفت باز، چاهک شماره ۳ نمونه کنترل مثبت، چاهک شماره ۴ کنترل منفي، چاهک های شماره ۵ و ۶ چاهک مربوط به ژن *csgD* با اندازه ۵۰۰ جفت باز و چاهک شماره ۷ کنترل مثبت.

در بين جدايه های اشريشيا کلي، ژن *csgA* در ۳۰ جدايه و ژن *csgD* در ۳۵ درصد آنها وجود داشت. حضور همزمان دو ژن در ۱۶ درصد جدايه ها مشاهده شد (نمودار ۲). آناليز

جدول ۱ - فراواني ژن های *csgA* و *csgD* در جدايه های اشريشيا کلي يوروپاتوژن بر اساس قدرت هيدروفوبيسيته باکتريايي

	هيدروفوبيسيته (درصد) تعداد		
	منفي	متوسط	قوي
<i>csgA</i>	۴(۲۰)	۱۰(۲۶/۳)	۱۳(۳۰/۹)
<i>csgD</i>	۷(۳۵)	۹(۲۳/۶)	۱۹(۴۵/۲)
<i>csgA+csgD</i>	۳(۱۵)	۴(۱۰/۵)	۸(۱۹)

## بحث

مطالعات قبلی اهمیت تشکیل بیوفیلم باکتریایی در عفونت مجاری ادراری خصوصا در سیستم مزمن و عفونت های مرتبط با سوندها را تایید می کنند (۲۰،۲۱). به احتمال زیاد، قابلیت تشکیل بیوفیلما می تواند با قدرت بیماریزایی سویه هایی از اشرشیاکلی که مجاری ادراری را آلوده می کنند نیز ارتباط داشته باشد. چسبیدن باکتری ها مرحله ای اساسی در فرآیند ایجاد عفونت محسوب می شود و نه تنها به آلوده سازی و تکثیر بلکه به تهاجم و آسیب سلول میزبان نیز منجر می شود. چسبندگی باکتریایی توسط فعل و انفعالات اختصاصی (شبه لیگاند-گیرنده) و غیراختصاصی (فیزیکی-شیمیایی) کنترل می شوند. همه ی نیروهای تعاملی به خواص فیزیکوشیمیایی زیر لایه ها و سطوح باکتریایی مانند هیدروفوبیسیتة (آب گریزی) بستگی دارند که در چسبندگی میکروارگانسیم ها به طیف گسترده ای از سطوح نقش ایفا می کند (۶،۷). در این مطالعه دو روش MATH و SAT جهت تعیین هیدروفوبیسیتة سلولی سویه های UPEC جدا شده از عفونت ادراری بیماران استفاده شدند. بر اساس نتایج آنگریزی سطحی با روش MATH ۴۲ درصد سویه ها قوی، ۳۸ درصد متوسط و ۲۰ درصد منفی بودند. با روش SAT ۶۳ درصد سویه ها هیدروفوبیسیتة قوی، ۲۵ درصد متوسط و ۱۲ درصد هیدروفیل بودند.

در مطالعه Raksha در سال ۲۰۰۳ که بر روی ۲۲۰ سویه ی UPEC جدا شده از عفونت ادراری صورت گرفت، ۵۸ سویه که مقدار SAT آنها، از ۱/۲۵ مولار کمتر بود دارای خاصیت هیدروفوبیک سطحی بودند (۲۲). Mohajeri و همکاران سال ۲۰۱۴ از بین ۲۰۵ ایزوله UPEC، ۳۹ (۱۹٪) را که در غلظت ۱/۴ مولار یا کمتر آمونیوم سولفات، تجمع داشتند دارای قدرت هیدروفوبیسیتة گزارش دادند (۲۳). Wafaa طی یک مطالعه در سال ۲۰۱۵ بر روی سویه های اشرشیا کلی یوروپاتوزن گزارش داد، (۴۵ درصد) سویه ها قدرت هیدروفوبیسیتة دارند (۲۴). Mittal سال ۲۰۱۵ سویه های اشرشیا کل یوروپاتوزنی را که مقدار SAT آنها از ۱/۲۵ مولار کمتر بود، به عنوان ایزوله های هیدروفوب تعیین کرد و فراوانی آنها را در سویه های تشکیل دهنده بیوفیلم ۵۰٪ نسبت به سویه های غیر بوفیلم ۶۲ درصد گزارش داد (۲۵). طی مطالعه Gogra سال ۲۰۱۰ فراوانی سویه های اشرشیا

کلی دارای قدرت هیدروفوبیسیتة سطحی بر اساس روش MATH ۶۴/۹ درصد در مقایسه با باکتری استفیلوکوکوس اورئوس که ۷۸/۲۵ درصد و قارچ اسپرژیلوس که ۵۰/۳۰ درصد گزارش شد (۲۶). تاج بخش و همکاران هم در سال ۱۳۹۲ به بررسی عامل اتصال و تشکیل بیوفیلم سویه های اشرشیا کلی یوروپاتوزن جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در سمنان پرداختند و میزان هیدروفوبیسیتة سلولی سویه ها را با روش MATH ۲۳ درصد گزارش دادند (۱). مشخص است که خصوصیات سطح باکتری از جمله هیدروفوبیسیتة در واکنش به محیط پیرامونی آن ها تغییر می کند. همبستگی میان روش ها و نقش هیدروفوبیسیتة در چسبندگی اغلب هنگامی اهمیت دارد که ارگانسیم های تحت بررسی تفاوت های بزرگی در هیدروفوبیسیتة و هیدروفیلیسیتة از خود به نمایش می گذارند (۲۰). مطالعات نشان داده که نتایج روش SAT بستگی به سن کشت میکروبی، تنوع ترکیبات غشای خارجی و بار سلولی دارد (۱۸،۱۹). در عوض به نظر می رسد بافرها و هیدروکربن های مورد استفاده در روش MATH هیدروفوبیسیتة را تحت تاثیر قرار می دهند (۱۹). فیمبریای کورلی که در ابتدا در *E. coli* شناسایی شد، در سطح سلول تجمع می یابد و به پروتئین های ماتریکس خارج سلولی مانند فیبرونکتین، لامینین و پلاسمینوزن متصل می شود. در نتیجه سبب راه افتادن چسبندگی باکتری به سلول های مختلف انسان می شود (۲۷). در این تحقیق سویه های اشرشیا کلی یوروپاتوزن مورد مطالعه حاوی ۳۵ درصد ژن *csqD* و ۳۰ درصد ژن *csqA* بودند و حضور همزمان ژن ها ۶۵ درصد گزارش شد. طی مطالعه Qin سال ۲۰۱۳ میزان فراوانی ژن های *csqA* در ایزوله های UPEC و ایزوله های کامنسال اشرشیا کلی به ترتیب ۳۰ درصد و ۳۴ درصد گزارش شد که نتایج اختلاف معنا داری را بین ایزوله ها نشان نداد (۲۸). مطالعه حاضر نشان داد که ارتباط معنا داری بین فراوانی ژن های کورلی با هیدروفوبیسیتة باکتری ها وجود ندارد. Renee و همکارانش سال ۲۰۰۷ در یک مطالعه، به بررسی تأثیر بیان کورلی (*curli*) و هیدروفوبیسیتة سطحی سلول بر اتصال به سطح کاهو پرداختند. مشخص شد که هیدروفوبیسیتة سویه *E. coli O157:H7* که کورلی تولید می کند از باکتری های *E. coli* دیگری که کورلی ندارند به میزان قابل توجهی بیشتر

گونه‌ها و سویه‌های در نظر گرفته شده باشد. حضور ژن های فیمبریای کورلی در بین جدایه های اشریشیاکلی یوروپاتوژن به عنوان یکی از عوامل ویروالانس این باکتری حائز اهمیت است که در این خصوص بررسی بیان این ژنها و نقش آنها در تشکیل بیوفیلم UPEC باید مورد توجه قرار گیرد.

#### تقدیر و تشکر

از همکاری صمیمانه جناب آقای مجید راندی کارشناس مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا در انجام این تحقیق که پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا است، تشکر و قدردانی می شود.

است (۲۹). Bokranz و همکارانش سال ۲۰۰۵ در مطالعه دیگری با تولید سویه‌های جهش‌یافته با جهش غیرفعال کننده *csgA* به ترتیب به بررسی نقش تولید کورلی و سلولز توسط *E. coli O157:H7* پرداختند. میزان اتصال *E. coli O157:H7* فاقد کورلی و سلولز به رده‌های سلولی کشت شده روده در مقایسه با سویه اصلی به میزان قابل‌ملاحظه‌ای کمتر بود (۳۰).

به طور کلی قدرت بالای هیدروفوبیسیته سلولی اشریشیاکلی یوروپاتوژن می تواند آغاز چسبندگی بین سلول ها و شروع روند تشکیل بیوفیلم و به دنبال آن عفونت ادراری و وقایع بعدی را تشدید کند. اختلاف خصوصیات هیدروفوبیک سلولی بر اساس نتایج روش های MATH و SAT ممکن است به خاطر ویژگی های متفاوت مورد بررسی توسط هر دو روش باشد. از طرفی نتایج متضاد منابع ممکن است بدلیل تعداد

#### منابع مورد استفاده

- ارباب سلیمانی، ن، امینی، ز، تاج بخش، ا، ۱۳۹۲. بررسی عامل اتصال و تشکیل بیوفیلم در اشریشیا کلی یوروپاتوژن جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری
- Ryu, J. H., Kim, J. H., Frank, F., Beuchat, L. R., 2004. Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157:H7 as affected by curli production. *Lett Appl Microbiol* 39: 359-362.
- Rivas, L., Fegan, G. A. N., Dykes, D., 2007. Attachment of shiga toxigenic *Escherichia coli* to stainless steel. *Int J Food Microbiol* 115: 89-94.
- Beloin, C. A., Houry, M., Froment, J. M., Ghigo, N., 2008. A short-time scale colloidal system reveals early bacterial adhesion dynamics. *PLoS Biol* 6: 1549-1558.
- Justice, S. S., Hung, C., Theriot, J. A., Fletcher, D. A., Anderson, G. G., Footer, M. J., Hultgren, S. J., 2004. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 101: 1333-1338.
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T. T., Vidal, O., Lejeune, P., Dorel, C., 2000. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* 2: 450-464.
- Reisner, A., Haagensen, J. A., Schembri, M. A., Zechner, E. L., Molin, S., 2003. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Mol Microbiol* 48: 933-946.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- Uppuluri, P., Chaturvedi, A. K., Srinivasan, A., Banerjee, M., Ramasubramanian, A. K., Kohler, J. R., 2010. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog* 6: e1000828.
- Ramage, G., Martinez J. P., Lopez-Ribot, J. L., 2006. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* 6: 979-986.
- Kolwzan, B., 2011. Analysis of biofilms-their formation and functioning. *Ochrona Srodowiska* 33: 3-14.
- Myszka, K., Czaczyk, K., 2011. Bacterial biofilms on food contact surfaces, a review. *Pol J Food Nutr Sci* 61: 173-180.
- Goulter, R. M., Gentle, I. R., Dykes, G. A., 2009. Issues in determining factors influencing bacterial attachment: a review using the attachment of *Escherichia coli* to abiotic surfaces as an example. *Lett Appl Microbiol* 49: 1-7.
- Doyle, R., 2000. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. *Microb Infect* 2: 391-400.

15. Ideses, D., Biran, D., Gophna, U., Levy-Nissenbaum, O., Ron, E. Z., 2005. The *lpf* operon of invasive *Escherichia coli*. International Journal of Medical Microbiology 295: 227-236.
16. Nwyanwu, C. E., Abu, G. O., 2013. Influence of growth media on hydrophobicity of phenol 1-utilizing bacteria found in petroleum refinery effluent. International Research Journal of Biological Science 2(10): 6-11.
17. Rosenberg, M., 1984. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. FEMS Microbiol Lett 22: 289-295.
18. Kadam, T.A., Rupa, L., Balhal, D.K., Totewad, N.D., Gyananath, G., 2009. Determination of the degree of hydrophobicity-a technique to assess bacterial colonization on the leaf surface and root region of lotus plant. Asian J Exp Sci 23: 135-139.
19. Nwyanwu, C. E., Abu, G. O., 2013. Influence of growth media on hydrophobicity of phenol-utilizing bacteria found in petroleum refinery effluent. Int Res J Biological Sci 2: 6-10.
20. Morris, N. S., Stickler, D. J., McLean, R. J. C., 1999. The development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters. World J Urol 17: 345-350.
21. Reid, G., Denstedt, J. D., Kang, Y. S., Lam, D., Nause, C., 1992. Microbial adhesion and biofilm formation on ureteral stents in vitro and in vivo. J Urol 148: 1592-1594.
22. Raksha, R., Srinivasa, H., Macaden, R. S., 2003. Occurrence and characterization of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract infections. Indian Journal of Medical Microbiology 21(2): 102-107.
23. Mohajeri, P., Khademi, H., Ebrahimi, R., Farahani, A., Rezaei M., 2014. Frequency distribution of virulence factors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from Kermanshah in 2011-2012. Int J Appl Basic Med Res 4(2): 111-116.
24. Wafaa, A., Mosallamy, E. L., Somaya, M., Desouky Abeer, A., El-Azm, A., Hasnaa, S. H., Hamid, A. E., 2015. Detection of some virulence factors and pyelonephritis - Associated pilus (*pap*) encoding operon gene in uropathogenic *Escherichia coli*. Egypt J Med Microbiol 24 (3): 37-43.
25. Mittal, S., Sharma, M., Chaudhary, U., 2015. Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. Pathog Glob Health 109(1): 26-29.
26. Gogra, A. B., Yao, J., Sandy, E. H., Zheng, S. H., Zaray, G., Koroma, B. M., Hui, Z., 2010. Cell surface hydrophobicity (CSH) of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus niger* and the biodegradation of Diethyl Phthalate (DEP) via Microcalorimetry. Journal of American Science 6(7): 127-139.
27. Chen, C. H., Christopher, S., Bryan, J., Terence, C., Strobaugh, P., Paoli, G. C., Nguyen, L. H., Yan, X., Uhlic, G. L., 2013. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm forming capabilities in non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* Strains PLOS ONE 8 (12): e84863.
28. Qin, X., Hu, F., Wu, S. H., Ye, X., Zhu, D., Zhang, Y., Wang, M., 2013. Comparison of adhesin genes and antimicrobial susceptibilities between uropathogenic and intestinal commensal *Escherichia coli* strains. PLOS ONE 8 (4): e61169.
29. Renee, R., Boyer, S., Summer, R. C., Merli, D. W., Knei, E. K., 2007. Influence of Curli expression by *Escherichia coli* O157:H7 on the cell's overall hydrophobicity, charge, and ability to attach to lettuce. J Food Protect 70(6): 1339-1345.
30. Bokranz, W., Wang, X., Tschäpe, H., Römling, U., 2005. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. J Med Microbiol 54(12): 1171-82.