

تشکیل بیوفیلم به روش میکرو تیترا پلیت و الگوی مقاومت بیوفیلمی *Escherichia coli* جدا شده از عفونت‌های کشت سیستم ادراری

احسان امیدی

کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی گرایش میکروبیولوژی، میکروب های بیمارزا

چکیده

عفونت‌های دستگاه ادراری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های بیمارستانی هستند که در اثر کلونی‌سازی باکتری *Escherichia coli* ایجاد شده و به بافت مخاطی میزبان صدمه می‌زنند. افزایش مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، و همچنین چسبندگی بیوفیلم باکتری‌های عفونت‌زا به سطوح شیشه‌ای و پلاستیکی تجهیزات بیمارستانی نیز مسئله‌ی دیگری است که درمان این نوع عفونت‌های ادراری باکتریایی را با مشکل مواجه کرده است. هدف از این مطالعه مطالعه‌ی نحوه‌ی تشکیل بیوفیلم و میزان مقاومت باکتری و همچنین مقاومت بیوفیلم به آنتی‌بیوتیک‌ها است. در این مطالعه، ۱۵۰ نمونه از بیماران مشکوک به عفونت دستگاه ادراری جمع‌آوری، روی محیط مک‌کانکی کشت، و در نهایت رنگ‌آمیزی شدند. بنابراین، برای بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و پروبیوتیکی بر روی بیوفیلم *Escherichia coli*، از دیسک آنتی‌بیوگرام آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (AM)، سیپروفلوکساسین (CP)، سفکسیم (CFM)، کوتریماکسازول (SXT) و جنتامایسین (GM) استفاده شد. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیستاتین نیز روی بیوفیلم *Escherichia coli* و باکتری آزاد *Escherichia coli* و تعیین نقطه‌ی MIC و MBC آن‌ها انجام شد. در آخر تأثیر آنتی‌بیوتیک نیستاتین بر روی باکتری پلانکتونی و بیوفیلم تعیین گردید. نتایج نشان داد که از مجموعه‌ی ۱۵۰ نمونه‌ی اولیه، ۲۳ نمونه (۱۵/۳۳) آلوده بودند و به کمک روش‌های بیوشیمیایی معمول و تست آنتی‌بیوگرام مشخص شد که از این بین، ۱۸ نمونه (۷۸/۲۶) حاوی باکتری *Escherichia coli* بودند. باکتری‌هایی که روی محیط افتراقی جلای سبز داشتند؛ به عنوان *Escherichia coli* جداسازی شدند. نمونه‌های جدا شده‌ی سیترات منفی (کاتالاز مثبت) دارای ویژگی‌های بیوشیمیایی سیترات منفی، کاتالاز مثبت، اندول مثبت، متحرک، بودند. در نتیجه، بهتر است در درمان عفونت ادراری ناشی از باکتری *Escherichia coli* از آنتی‌بیوتیک کوتریماکسازول به عنوان درمان خط اول استفاده نکرد و از تشکیل بیوفیلم روی هر سطحی جلوگیری کرد چون بیوفیلم باکتری مقاوم‌تر بوده و همچنین پروبیوتیک‌ها روی بیوفیلم تشکیل شده تأثیر ضد میکروبی نشان نمی‌دهند.

واژه‌های کلیدی: عفونت ادراری، *Escherichia coli*، بیوفیلم، پروبیوتیک، *Lactobacillus*

مقدمه و بیان مسئله

بیماری عفونت ادراری دومین بیماری شایع جهان است که هر ساله ۱۵۰ میلیون نفر در سرتاسر جهان به آن مبتلا می‌شوند (Astal, 2005, 457). آنتی‌بیوتیک‌ها اثرات چشمگیری در درمان این عفونت‌های باکتریایی دارند اما بسیاری از باکتری‌ها به سرعت نسبت به این داروهای خط اول مقاوم می‌شوند (Gold and Moelleing, 1996, 1445). به دنبال توسعه‌ی ارگانسیم‌های مقاوم به ترکیبات آنتی‌بیوتیکی هزینه‌های درمانی افزایش یافته است. بستری شدن طولانی مدت بیماران و دوره‌ی نقاهت ناشی از شکست درمان‌های آنتی‌بیوتیکی از عوامل افزایش این هزینه‌ها می‌باشند (Kollef and Fraser, 2001, 298). مقاومت باکتری‌های خانواده Enterobacteriacea به عوامل ضد میکروبی مختلف مانند نسل سوم سفالوسپورین مورد بررسی قرار گرفته است و می‌توان گفت که حضور باکتری‌های گرم منفی مقاوم به این آنتی‌بیوتیک نشان‌دهنده‌ی اهمیت نظارت بر این فنوتیپ است (Gangoue et al, 2006, 232-234). خانواده Enterobacteriacea است که به‌طور شایع در روده‌ی جانوران خونگرم وجود دارد. بیش‌تر سویه‌های *Escherichia coli* بی‌آزار هستند اما برخی از سروتیپ‌ها مانند O157:H7 موجب مسمویت غذایی و اسهال می‌شود (Paton and Paton, 1998, 453). بیماری‌زایی این سروتیپ به این صورت است که این باکتری در روده باقی مانده و سمومی تولید می‌کند که از طریق روده جذب شده و وارد جریان خون می‌شود (Paton and Paton, 1998, 454). این سویه‌های بیماری‌زا به علت تولید توکسین‌های مشابه به شیگلا، ساختار و عملکرد توکسین‌ها و نحوه‌ی برهم کنش آن‌ها با گیرنده‌های سلول‌های میزبان و جنبه‌های بالینی بیماری بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (Paton and Paton, 1998, 451). در پزشکی برای درمان بیماری‌های روده‌ای به ویژه بیماری‌های التهابی روده، از باکتری *Escherichia coli* سویه Nissle 1917 به عنوان پروبیوتیک نیز استفاده شده است (Grozdanov et al, 2004, 5432). به‌طور کل *Escherichia coli* از ساکنین طبیعی روده‌ی انسان و حیوان به شمار می‌رود، اما در آب، خاک و حتی گیاهان نیز یافت می‌شود. *Escherichia coli* یکی از شایع‌ترین عوامل باکتریایی است که از عفونت‌های انسانی جدا شده است (Paton and Paton, 1998, 451). از ویژگی‌های مهم این باکتری‌ها تشکیل کلونی در روده‌ی انسان، مقاومت به اسیدیته‌ی معده (Paton and Paton, 1998, 454) و توانایی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها است (Paton and Paton, 1998, 468). این باکتری از مهم‌ترین علل میکروبی شایع در عفونت‌های ادراری است و عامل بسیاری از حداقل ۴۰ درصد از کل عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌رود (De Francesco et al, 2007, 137). بیوفیلیم، توده‌ی به هم پیوسته‌ای از سلول‌های باکتریایی است که در یک پوشش ماتریکسی پلیمری متشکل از پلی‌ساکارید، پروتئین و DNA محصور شده است. درمان آنتی‌بیوتیکی این توده‌ها به خاطر نحوه‌ی رشد بیوفیلیم با شکست مواجه می‌شود. تشکیل بیوفیلیم در گونه‌های مختلف باکتری‌ها از جمله *Pseudomonas aeruginosa* (Ciofu et al., 2012, 215) و *Escherichia coli* (Ciofu et al., 2012, 220) مشاهده شده است که به خصوص در مبتلایان به بیماری کیستیک فیبروزیس، تشکیل بیوفیلیم‌های *Pseudomonas* در راه‌های هوایی بیماران یکی از عوامل مهم در طولانی شدن دوره‌ی درمان می‌باشد (Ciofu et al., 2012, 215).

در اصل، بیوفیلیم مجموعه‌ای از سلول‌های زنده‌ی باکتریایی می‌باشد که به سطوح و همدیگر متصل می‌شوند. در طبیعت و سیستم‌های غذایی، میکروارگانسیم‌ها با کمک مواد غذایی به سطوح سخت می‌چسبند و به این ترتیب به راحتی رشد می‌نمایند. این میکروارگانسیم‌ها در مراحل اول بر روی سطوح رسوب می‌نمایند و در مراحل بعدی به این سطوح متصل گشته، رشد نموده و تکثیر یافته و ایجاد پرگنه می‌نمایند. این پرگنه‌ها در مراحل بعدی بزرگ‌تر شده و سایر مواد آلی و غیر آلی، مواد

مغذی و سایر میکروارگانیسم‌ها را به تله می‌اندازند و به این ترتیب بیوفیلیم میکروبی ایجاد می‌شود. اصطلاح بیوفیلیم مربوط به ماتریکس فعال بیولوژیکی سلول‌ها و مواد خارج سلولی است که در یک سطح سخت مشاهده می‌شود (Movassagh Ghazani et al., 2008, 221). بیوفیلیم‌ها در تمام محیط‌های آبی مشاهده می‌شوند و تشکیل بیوفیلیم یک فرایند دینامیک است و شامل مراحل متعددی می‌شود. امکان تشکیل بیوفیلیم در هر سطحی که در محیط حاوی باکتری‌ها قرار گیرد، وجود دارد (Movassagh Ghazani et al., 2008, 221) اما شاهدهی دال بر این که میکروارگانیسم‌ها همواره به سطوح آماده می‌چسبند وجود ندارد (Movassagh Ghazani et al., 2008, 222). همچنین مشخص گردیده که اتصال برخی پروتئین‌ها به سطوح نقش مهمی در اتصال میکروبی دارد (Movassagh Ghazani et al., 2008, 223). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان و پیشگیری از عفونت ادراری نه تنها باعث مقاومت دارویی در آن‌ها می‌شود بلکه سبب به هم خوردن فلور طبیعی مفید دستگاه گوارش شده و بدن را مستعد به انواعی از بیماری‌های روده‌ای از قبیل اسهال می‌کند. در مقابل استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌هایی که در محیط زنده با عامل میکروبی پاتوژن مقابله می‌کنند می‌تواند از طریق خوراکی فرد را در برابر عامل بیماری‌زا مصون کند (فاضلی و همکاران، ۱۳۸۳، ۲۷). طبق مطالعات نادری و همکاران می‌توان از *Lactobacillus casei* به عنوان یک کاندید احتمالی به عنوان یک پروبیوتیک علیه *Escherichia coli* عامل عفونت ادراری، استفاده کرد (نادری، ۱۳۸۹، ۱). بنابراین بررسی رابطه‌ی بین پروبیوتیک و اثر آنتی‌بیوتیک بر باکتری‌های مجاری ادراری امر مهمی تلقی می‌شود.

فرضیه‌های پژوهش

- ۱- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت می‌باشد.
- ۲- امکان تشکیل بیوفیلیم از *Escherichia coli* جدا شده در محیط آزمایشگاهی وجود دارد.
- ۳- تشکیل بیوفیلیم باکتری باعث ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های ایجادکننده عفونت‌های دستگاه ادراری می‌شود.
- ۴- امکان بررسی الگوی مقاومت پروبیوتیکی توسط *Lactobacillus* ها وجود دارد.

روش تحقیق

روش تحقیق حاضر به صورت آزمایشگاهی می‌باشد. برای تهیه‌ی محیط مکانکی آگار به میزان ۵۰ گرم از محیط با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شده و در ۱ لیتر آب مقطر حل شد، سپس در دهانه‌ی ارلن پنبه قرار داده و ارلن روی حرارت قرار داده شد و پس از رسیدن به نقطه‌ی جوش از روی حرارت برداشته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند اتوکلاو گردید. بعد از اتمام زمان اتوکلاو، ارلن به دمای محیط یعنی ۴۵ درجه سانتی‌گراد رسید و بعد، تحت شرایط استریل (زیر هود و کنار شعله) محیط به داخل پلیت‌های مورد نظر ریخته شد. برای تهیه‌ی این محیط، ۳۶ گرم از محیط با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن شد و در ۱ لیتر آب مقطر حل گردید و در دهانه‌ی ارلن با پنبه پوشانده شد و سپس روی حرارت قرار گرفت تا به نقطه‌ی جوش برسد و به محض رسیدن به نقطه‌ی جوش از روی حرارت برداشته و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند اتوکلاو شد. سپس به دمای محیط (۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) رسید و بعد از رسیدن به این دما، تحت شرایط استریل یعنی زیر هود و کنار شعله محیط به داخل پلیت‌های مورد نظر ریخته شد. برای تهیه‌ی این محیط کشت به میزان ۳۰ گرم از محیط با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری و در ۱ لیتر آب مقطر حل شد و

دهانه‌ی ارلن با پنبه پوشانده و سپس روی حرارت قرار داده شد و به محض رسیدن به نقطه‌ی جوش از روی حرارت برداشته و در لوله‌های آزمایش بلند تقسیم گردید و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند اتوکلاو شد. بعد از اتمام زمان اتوکلاو، لوله‌ها از اتوکلاو خارج شده و به صورت کج قرار داده شدند تا سطح مناسبی برای کشت سطحی حاصل شود. بعد از بستن محیط در لوله، لوله‌ها تا زمان مصرف به یخچال منتقل شدند. برای تهیه‌ی این محیط کشت به میزان ۲۴/۲۸ گرم از محیط با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد و در ۱ لیتر آب مقطر حل گردید، سپس در دهانه‌ی ارلن پنبه قرار داده و به ارلن تا رسیدن به نقطه‌ی جوش حرارت داده شد و به محض رسیدن به نقطه‌ی جوش از روی حرارت برداشته و در لوله‌های آزمایش بلند تقسیم گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند اتوکلاو گردید. بعد از اتمام زمان اتوکلاو و خارج کردن لوله‌ها از اتوکلاو، آن‌ها به صورت کج قرار شدند تا سطح مناسبی برای کشت سطحی حاصل شود. محیط‌های کشت تهیه شده تا زمان مصرف به یخچال منتقل شدند. برای تهیه‌ی این محیط کشت به میزان ۳۶/۲۳ گرم از محیط با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری و در ۱ لیتر آب مقطر حل شد و سپس روی حرارت قرار گرفت تا به نقطه‌ی جوش برسد. به محض رسیدن به نقطه‌ی جوش، ارلن از روی حرارت برداشته و محیط کشت در لوله‌های آزمایش بلند به میزان ۲۵۰ سی سی ریخته و دهانه‌ی لوله‌ها با پنبه مسدود شد و سپس، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند اتوکلاو گردید. بعد از اتمام زمان اتوکلاو، لوله‌ها به صورت عمود قرار داده شدند تا محیط نیمه جامد بسته شود.

برای تهیه‌ی این محیط کشت، به میزان ۳۶/۲۳ گرم از محیط با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد و در ۱ لیتر آب مقطر حل گردید و سپس در لوله‌ی آزمایش تقسیم شده و دهانه‌ی لوله‌ی آزمایش با پنبه مسدود کرده و بدون حرارت دادن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند اتوکلاو گردید. بعد از اتمام زمان اتوکلاو، لوله‌ها به صورت عمود قرار داده شدند. بعد از گذشت چند ساعت محیط‌های کشت تا زمان مصرف به یخچال منتقل شدند.

برای تهیه‌ی این محیط کشت به میزان ۳۴ گرم از محیط با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری و در ۱ لیتر آب مقطر حل شد. دهانه‌ی ارلن با پنبه پوشانده و سپس روی حرارت قرار داده شد. به محض رسیدن به نقطه‌ی جوش، ارلن از روی حرارت برداشته و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند اتوکلاو گردید. بعد از اتمام زمان اتوکلاو و خارج کردن ارلن از اتوکلاو و رسیدن دمای آن به دمای محیط (۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) تحت شرایط استریل (زیر هود و کنار شعله) محیط کشت به داخل پلیت‌های مورد نظر ریخته شد. برای تهیه‌ی این محیط کشت به میزان ۶۸/۲ گرم از محیط با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد و در ۱ لیتر آب مقطر حل گردید. دهانه‌ی ارلن با پنبه پوشانده و سپس ارلن روی حرارت قرار داده شد تا به نقطه‌ی جوش برسد و به محض رسیدن به نقطه‌ی جوش از روی حرارت برداشته و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند اتوکلاو گردید. بعد از اتمام زمان اتوکلاو و خارج کردن ارلن از اتوکلاو و رسیدن دمای آن به دمای محیط یا ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، محیط کشت تحت شرایط استریل (زیر هود و کنار شعله) به داخل پلیت‌های مورد نظر ریخته شد.

برای تهیه‌ی این محیط کشت به میزان ۵۲/۲ گرم از محیط با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری کرده و در ۱ لیتر آب مقطر حل گردید. سپس، به مقدار ۱۰۰ سی سی از محیط در لوله‌ی دربیچ دار ریخته شد و بدون حرارت دادن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند اتوکلاو گردید. برای تهیه‌ی این محیط کشت به میزان ۴۰ گرم از محیط با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری و در ۱ لیتر آب مقطر حل شد. سپس، دهانه‌ی ارلن با پنبه پوشانده شد و

سپس روی حرارت قرار گرفت و به محض رسیدن به نقطه‌ی جوش، ارلن از روی حرارت برداشته و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند اتوکلاو گردید. بعد از اتمام زمان اتوکلاو، ارلن به دمای محیط یا ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد رسید و بعد، محیط‌کشت تحت شرایط استریل (زیر هود و کنار شعله) به درون پلیت‌های مورد نظر ریخته شد. برای تهیه‌ی این محیط‌کشت به میزان ۳۰ گرم از محیط با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری و در ۱ لیتر آب مقطر حل گردید و سپس به میزان ۱۰ سی سی از محیط در هر لوله ریخته شد و بدون حرارت دادن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند اتوکلاو گردید.

برای تهیه‌ی این محیط‌کشت به میزان ۲۱ گرم از محیط با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری و در ۱ لیتر آب مقطر حل شد. سپس به مقدار ۱ میلی‌لیتر از محیط‌کشت در لوله‌هایی با قطر ۱۰ میلی‌متر ریخته و دهانه‌ی لوله‌ها با پنبه پوشانده شد و سپس، لوله‌ها در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد، در فشار ۱۵ پوند به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردیدند. ابتدا محیط‌کشت Tryptic Soy Agar در حجم مورد نیاز تهیه شد و پس از اتوکلاو کردن با استفاده از فیلتراسیون با فیلتری با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون، محلول ۰/۲ درصد گلوکز به محیط اضافه گردید. ابتدا محیط‌کشت Tryptic Soy Broth در حجم مورد نیاز تهیه شد و پس از اتوکلاو کردن با استفاده از فیلتراسیون با فیلتر ۰/۴۵ میکرونی، محلول ۰/۲ درصد گلوکز به محیط اضافه شد. برای تهیه‌ی PBS یک عدد از قرص PBS در ۵۰۰ میلی‌لیتر از آب مقطر حل گردید و سپس دهانه‌ی ارلن با پنبه پوشانده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد در فشار ۱۵ پوند اتوکلاو گردید. برای تهیه‌ی نیم مک فارلند، بعد از ایزوله‌ی باکتری مورد نظر در زیر هود و کنار شعله با استفاده از آنس یا لوپ مقداری از هر باکتری برداشته و در بافر فسفات سالین (PBS) حل گردید (برای حل کردن می‌توان از ورتکس استفاده کرد) سپس مقداری از باکتری حل‌شده در بافر فسفات سالین در کوت‌های استریل ریخته شد و سپس با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر میزان کدورت آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد تا زمانی که سوسپانسیونی با جذب نوری معادل ۰/۱ ppm در طول موج ۶۰۰ نانومتر بدست آمد. در صورت غلیظ بودن و به دست آمدن عددی بالاتر از ۰/۱ ppm، با اضافه کردن بافر فسفات سالین PBS غلظت را کاهش داده می‌شود و اگر دستگاه اسپکتوفتومتر عددی پایین تر از ۰/۱ ppm را نشان بدهد با اضافه کردن باکتری میزان غلظت افزایش داده می‌شود. به این صورت نیم مک فارلند یعنی سوسپانسیونی که در طول موج ۶۰۰ نانومتر جذب نوری ۰/۱ ppm را در دستگاه الیزا نشان بدهد این سوسپانسیون حاوی $10^8 \times 1/5$ باکتری است. ۲۰۰ سی سی آب مقطر با ۳۰۰ سی سی الکل و ۰/۱ گرم متیل رد مخلوط گردید و با پنبه دهانه‌ی آن پوشانده و در جای تاریک قرار داده شد. سوپرناتانت (عصاره‌ی اسیدوفیلوس) طی ۳ مرحله و در ۴ روز تهیه شد. مرحله‌ی اول: باکتری اسیدوفیلوس خالص بر روی محیط MRS Agar کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در جار بی‌هوای انکوبه گردید.

مرحله‌ی دوم: مقداری از باکتری اسیدوفیلوس رشد یافته روی محیط‌کشت MRS Agar با استفاده از لوپ برداشته و در یک لوله‌ی حاوی محیط‌کشت MRS Broth حل گردید. درب لوله‌ی آزمایش به اندازه‌ی نیم دور باز کرده و در جار بی‌هوای در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. مرحله‌ی سوم: بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، لوله‌ی آزمایش به آرامی از جار بیرون آورده شد و مایه‌ی رویی آن با استفاده از سرنگ استریل برداشته و در میکروتیوپ استریل ۲ میلی‌لیتری ریخته و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در دور ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. بعد از اتمام سانتریفیوژ میکروتیوپ‌ها به آرامی به زیر هود انتقال داده شدند و در شرایط استریل و با استفاده از سرنگ استریل، مایع رویی آن برداشته و با استفاده از فیلتری با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرونی به داخل یک لوله‌ی استریل فیلتر گردید.

روش انجام کار

نمونه برداری

۱۵۰ نمونه‌ی ادراری از بیماران مراجعه‌شده به بیمارستان امیرالمومنین تبریز (بیمارستان کلیوی) با توجه به شرایط لازم جهت نمونه‌گیری، گرفته شد. این تعداد نمونه در طول ۲ هفته گرفته شدند که نمونه‌ها به محض دریافت در محیط مک‌کانکی آگار و بلاذ آگار کشت داده شدند.

جداسازی و افتراق باکتری مورد نظر

باکتری مورد نظر در این مطالعه *Escherichia coli* بود که برای جداسازی آن، نمونه‌ها به محض این‌که به آزمایشگاه آورده شدند بر روی محیط افتراقی مک‌کانکی آگار یا MC کشت داده شدند. این محیط به دلیل داشتن نمک‌های صفراوی و مقدار کمی کریستال ویوله از رشد باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری می‌کند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نتایج به دست آمدند.

رنگ آمیزی گرم

جهت جداسازی باکتری *Escherichia coli* و مشاهده‌ی باسیل، نمونه‌هایی رنگ‌آمیزی شدند که نتیجه‌ی کشت آن‌ها روی محیط مک‌کانکی مثبت بود و روی این محیط رشد کرده بودند.

روش رنگ آمیزی گرم

- ۱- تهیه‌ی گسترش روی لام: ابتدا از نمونه‌ی باکتری یک گسترش روی لام تهیه شد.
- ۲- رنگ‌آمیزی با رنگ کریستال ویوله: در این مرحله، مقداری از رنگ کریستال ویوله با قطره‌چکان روی سطح گسترش میکروبی ریخته شد و پس از ۱ دقیقه، رنگ به دیواره‌ی سلولی میکروب‌ها نفوذ کرد.
- ۳- شستشو: پس از ۱ دقیقه، رنگ اضافی از روی لام خالی و با استفاده از آب مقطر سطح روی گسترش شستشو داده شد.
- ۴- اضافه کردن محلول ید: چند قطره از محلول ید روی گسترش ریخته و پس از ۱ دقیقه، محلول اضافی خالی شده و لام با آب مقطر شستشو داده شد.
- ۵- رنگ‌بری با استفاده از استون-الکل: لام با زاویه‌ی ۴۵ درجه نگاه‌داشته شد و بعد با استفاده از محلول رنگ‌بر استون-الکل که بر روی گسترش ریخته شد، به سرعت رنگ آن بی‌رنگ گردید و سپس، لام به سرعت شسته شد.
- ۶- رنگ‌آمیزی با سافرانین: در این مرحله، سطح گسترش با رنگ ثانویه یعنی سافرانین پوشانده و پس از ۳۰ تا ۶۰ ثانیه، رنگ اضافی خالی و لام با آب مقطر شستشو داده شد.
- ۷- سپس، لام رنگ‌آمیزی‌شده به آهستگی روی کاغذ خشک‌کن قرار داده شد.
- ۸- برای مشاهده‌ی لام زیر میکروسکوپ، لام‌ها زیر میکروسکوپ قرار داده شدند و هر نمونه‌ای که در زیر میکروسکوپ باسیل گرم‌منفی را نشان داد؛ جهت جداسازی باکتری *Escherichia coli* در محیط‌های افتراقی کشت داده شد.

کشت در محیط افتراقی جهت جداسازی باکتری *Escherichia coli*

برای جداسازی باکتری *Escherichia coli* از سایر باسیل‌های گرم‌منفی از محیط EMB آگار استفاده شد. محیط EMB آگار یک محیط اختصاصی برای باکتری *Escherichia coli* به شمار می‌رود؛ چون این باکتری در این محیط جلای قرمز تولید می‌کند؛ به همین منظور، نمونه‌های مثبت روی محیط EMB آگار کشت داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت-انکوباسیون، نتایج به دست‌آمده ثبت شدند.

آزمایشات بیوشیمیایی برای شناسایی *Escherichia coli*

جهت شناسایی کامل باکتری *Escherichia coli* در نمونه‌های مثبت آزمایش کاتالاز و اکسیداز و IMVic در آزمایشات این مرحله از محیط‌های Triple sugar iron agar یا TSI، سیمون سیترات، SIM، MR و VP استفاده شد.

روش انجام آزمایش کاتالاز

۱- یک کلنی از باکتری رشد یافته بر روی محیط EMB آگار برداشته و بر روی لام حاوی یک قطره آب مقطر قرار داده شد و در آب مقطر حل گردید.

۲- یک قطره پراکسید هیدروژن روی لام ریخته و به وسیله‌ی آنس با باکتری مخلوط شد.

پس از بررسی و مشاهده‌ی لام، نتیجه‌ی آزمایش کاتالاز و تصویر آن ثبت گردید.

روش کشت در محیط کشت تریپل شوگر ایرون آگار (Triple Sugar Iron agar)

یک کلنی از باکتری محیط کشت EMB آگار با آنس برداشته و در محیط فرو برده شد (کشت عمقی) و بعد به آرامی بیرون کشیده و با آنس روی سطح محیط به صورت زیگزاگی کشیده شد (کشت سطحی). نتایج حاصل از این کشت در جدول ۱ ارائه گردیده است.

روش کشت در محیط کشت سیمون سیترات آگار (Simmon Citrate Agar)

یک کلنی از باکتری رشد یافته بر روی محیط EMB آگار نمونه‌ی بیمارستانی با استفاده از لوپ برداشته و به صورت زیگزاگی بر روی سطح محیط کشت کشیده شد (کشت فقط سطحی). نتایج حاصل از این کشت در جدول ۱ ارائه شده است. یک کلنی از باکتری‌های رشد یافته بر روی محیط کشت EMB آگار حاصل از نمونه‌های بیمارستانی با استفاده از آنس برداشته و به صورت عمقی و صاف به درون محیط کشت برده شد. نتایج حاصل از این کشت در جدول ۱ ارائه گردیده است. برای کشت باکتری در محیط MR و VP دو لوله‌ی حاوی محیط کشت MR و VP برداشته شد. یک لوله به عنوان لوله‌ی آزمایش MR و لوله‌ی دیگر به عنوان آزمایش VP در نظر گرفته شد. در هر دو لوله، یک کلنی از باکتری رشد یافته بر روی محیط کشت EMB آگار حاصل از نمونه‌های بیمارستانی با استفاده از آنس برداشته و کشت داده شد. نتایج حاصل از این کشت در جدول ۱ ارائه گردیده است. پس از ایزوله کردن باکتری *Escherichia coli* هر یک از نمونه‌ها، برای تمام نمونه‌ها نیم مک فارلند تهیه شد که طبق CLSI تعداد باکتری در این مطالعه نیز 10^8 بود. سپس سوآپ استریل به درون سوسپانسیون نیم مک فارلند وارد گردید و بعد سوآپ به دیواره‌ی لوله کشیده شد تا آب آن به طور کامل بچکد و سپس بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (Muller Hinton Agar) به صورت چمنی کشت داده شد. با استفاده از پنس استریل، آنتی بیوتیک‌ها برداشته و بر روی محیط کشت با ۲ سانتی‌متر فاصله قرار داده شدند. سپس محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند و نتایج حاصله ثبت گردید. پس از ایزوله کردن باکتری *Escherichia coli* هر یک از نمونه‌ها، برای تمام نمونه‌ها نیم مک فارلند تهیه و سپس سوآپ استریل به درون سوسپانسیون نیم مک فارلند برده و بعد سوآپ به دیواره‌ی لوله کشیده شد تا آب آن به طور کامل بچکد و سپس، بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (Muller Hinton Agar) به صورت چمنی کشت داده شد. سپس با استفاده از لوله‌هایی استریل با قطر ۱۰ میلی‌متر، ۴ چاهک در پلیت و با فاصله‌های ۲ سانتی‌متر از همدیگر ایجاد کرده و با استفاده از سمپلر استریل و محیط مولر هینتون آگار استریل، چاهک‌ها ته‌گیری شد تا از نشت عصاره به ته محیط جلوگیری شود.

بعد از ته‌گیری با استفاده از سمپلر مقادیر ۱۰۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ میکرولیتری از محیط برداشته شده و در درون هر یک از چاهک‌ها ریخته و چاهک چهارم به عنوان نمونه‌ی شاهد در نظر گرفته و MRS براث استریل در داخل چاهک ریخته شد. برای دیسک‌سازی سوپرناتانت، مقادیر ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکرولیتر از سوپرناتانت با استفاده از سمپلر برداشته و بر روی دیسک بلانک که در یک پلیت خالی قرار داده شده بودند، ریخته شد. پس از خشک شدن، دیسک‌ها را برداشته و با فاصله‌ی ۲ سانتی‌متری روی محیط کشت مولر هینتون آگار که باکتری بر روی آن به صورتی چمنی کشت داده شده بود، قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید و روز بعد نتایج مشاهده شد و هاله‌های تشکیل شده‌ی اطراف چاهک و دیسک‌های بلانک اندازه‌گیری شدند. پس از انجام مراحل فوق، نتایج ثبت گردید.

روش انجام آزمایش بررسی نحوه‌ی تشکیل بیوفیلم در لوله‌های شیشه‌ای (روش لوله‌ای)

روز اول: برای انجام روش لوله‌ای، در ابتدا باکتری در محیط کشت TSA + ۰/۲ درصد گلوکز کشت و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید.

روز دوم: از محیط کشت TSA + ۰/۲ درصد گلوکز ۱۰ میلی‌لیتر برداشته و در محیط TSB + ۰/۲ درصد گلوکز حل کرده و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی جدا کرده و به هر لوله افزوده شد. لوله‌ها در حالت ثابت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گرماگذاری شدند.

روز سوم: پس از طی زمان گرماگذاری، محتویات هر لوله آسپیره شده و هر لوله ۵ بار با بافر فسفات سالین شستشو داده شد و پس از خشک شدن، ۱۰ میلی‌لیتر از محلول کریستال ویوله‌ی ۲ درصد به هر لوله اضافه شده و پس از ۵ دقیقه رنگ از کریستال ویوله خارج شد و لوله‌های شسته شده و با اسید استیک ۳۳ درصد رنگ‌بری شدند. با این روش، تشکیل بیوفیلم به صورت کیفی ارزیابی می‌شود. شدت رنگ نشان‌دهنده‌ی میزان تشکیل بیوفیلم است. به منظور کمی‌سازی این روش، ۱۰۰ میکرولیتر از هر لوله به یک چاهک در میکروتیتر منتقل شده و سپس نتایج با استفاده از ELISA Plate Reader در طول موج ۶۵۰ نانومتر خوانده شدند. مطالعات آماری داده‌های حاصل از ۱۸ نمونه‌ی مورد تأیید به کمک نرم‌افزار SPSS ver. 16 و به روش ANOVA دو عاملی انجام و مقادیر میانگین، P-value حاصل و سایر نتایج مربوطه در فصل نتایج ارائه شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از اتمام روش میکروتیتر پلیت، نتایج حاصل توسط دستگاه الایزا ریدر به این صورت ثبت شد که نمونه‌ی ۹۸ با میزان جذب نوری برابر با ۰/۳۹۲ ppm بیش‌ترین جذب نوری را داشت (جدول ۴-۵). بنابراین، این نمونه نسبت به سایر نمونه‌های دیگر قدرت تشکیل مقدار زیادی از بیوفیلم را دارد.

جدول ۱- مقادیر جذب نوری نمونه‌ها در دستگاه الایزا.

شماره	میزان جذب نوری ناشی از تولید	میزان جذب نوری ناشی از تولید
نمونه‌ها	بیوفیلم به روش میکروپلیت	بیوفیلم به روش لوله‌ای (نانومتر)
۲	۰/۲۴۴	۰/۰۷۱
۵	۰/۱۴۴	۰/۰۴۵
۶	۰/۱۶۴	۰/۰۶۱

۰/۶۶	۰/۲۲۱	۱۶
۰/۰۳۹	۰/۱۳۲	۱۹
۰/۰۹۳	۰/۳۴۳	۳۸
۰/۰۳۲	۰/۱۱۷	۴۰
۰/۰۵۹	۰/۱۶۳	۶۹
۰/۰۴۹	۰/۱۴۶	۱۹
۰/۰۳۰	۰/۱۰۴	۹۰
۰/۰۳۶	۰/۱۲۹	۹۴
۰/۰۴۲	۰/۱۴۰	۹۵
۰/۰۵۵	۰/۱۵۰	۹۷
۰/۱۱۲	۰/۳۷۲	۹۸
۰/۰۳۴	۰/۱۲۳	۱۰۷
۰/۰۳۳	۰/۱۱۹	۱۱۶
۰/۰۳۲	۰/۱۱۲	۱۴۶

رنگ سبز نشان دهنده‌ی نمونه‌هایی با جذب نوری بالا است.

پس از انجام روش لوله‌ای و ثبت نتایج به وسیله‌ی دستگاه ELISA Plate Reader این نتایج به دست آمد که میزان قدرت چسبندگی بیوفیلیم *Escherichia coli* بسیار کم است، پس به راحتی در اثر شستشو با بافر فسفات سالیین از بین می‌رود. اما با این حال، باز قدرت چسبندگی و تشکیل بیوفیلیم نمونه‌ی ۹۸ نسبت به ۱۷ نمونه‌ی دیگری زیاد و میزان جذب نوری آن در روش لوله‌ای برابر با ۰/۰۷۱ ppm بود.

از تست‌های فوق می‌توان نتیجه گرفت که باکتری *Escherichia coli* قادر به تشکیل بیوفیلیم در سطوح مختلف است اما قدرت تشکیل بیوفیلیم و چسبندگی آن به سطح پلاستیکی بیش‌تر از سطوح شیشه‌ای است؛ به همین دلیل، بهتر است در مراکز بهداشتی و درمانی از جمله بیمارستان‌ها از لوازم شیشه‌ای استفاده شود تا تشکیل بیوفیلیم باکتری *Escherichia coli* به حداقل برسد.

نتایج حاصل از روش بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و پروبیوتیکی بر روی بیوفیلیم *Escherichia coli*

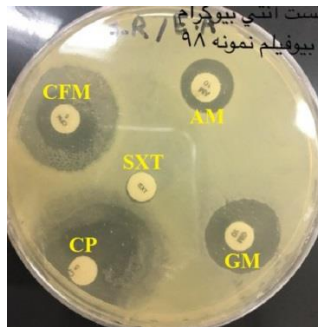
نتایج حاصل از این تست نشان داد که بیوفیلیم نمونه‌ی ۹۸ نسبت به سه آنتی‌بیوتیک کوتریماکسازول (STX)، آمپی‌سیلین (AM) و سفکسیم (CFM) مقاوم است. سایر نتایج در جدول ۴-۶ ارائه شده‌اند:

جدول ۲- نتایج تست بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و پروبیوتیکی بر روی بیوفیلیم نمونه‌ی انتخابی.

GM	CFM	AM	CP	STX	آنتی‌بیوتیک‌ها
S	R	R	I	R	بیوفیلیم نمونه‌ی ۹۸

S: حساس؛ R: مقاوم، I: نیمه-حساس

شکل ۱- نتیجه‌ی تست آنتی‌بیوگرام نمونه‌ی ۹۸ را نشان می‌دهد (شکل ۴-۸):

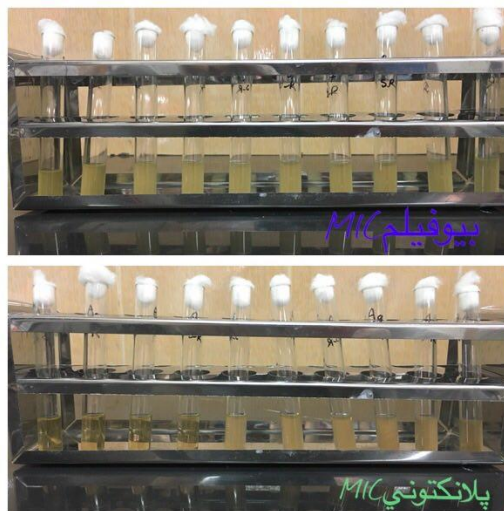


با توجه به هاله‌ی تشکیل شده و مقایسه‌ی حالت پلانکتونی این نمونه، میزان قطر هاله‌ها بسیار کاهش یافته و این نشان‌دهنده‌ی این است که باکتری در حالت بیوفیلیم مقاوم‌تر است؛ پس باید در تمام سطوح و حتی در بدن نیز از تشکیل بیوفیلیم جلوگیری کرد.

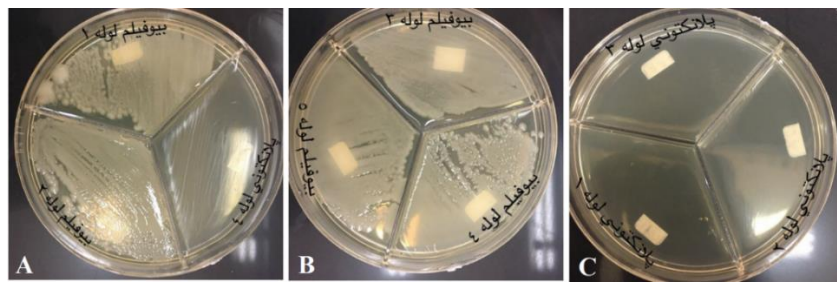
نتایج بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیستاتین بر روی بیوفیلیم *Escherichia coli* و باکتری آزاد *Escherichia coli* و تعیین نقطه‌ی MIC و MBC آن‌ها

در نتیجه، از این آزمایش می‌توان فهمید که بیوفیلیم باکتری *Escherichia coli* بسیار قوی‌تر از بیوفیلیم باکتری پلانکتونی *Escherichia coli* است و نیستاتین بر روی باکتری پلانکتونی موثر بوده اما روی بیوفیلیم اثری ندارد. پس باید سعی کرد از تشکیل بیوفیلیم باکتری *Escherichia coli* در نقاط مختلف جلوگیری کرد؛ چون از بین بردن آن به آنتی‌بیوتیک‌هایی قوی نیاز دارد (شکل ۴-۱۱).

نقطه‌ی MIC در مورد باکتری پلانکتونی نمونه‌ی ۹۸، ۱۲۵ میکرولیتر است و نقطه‌ی MBC نیز بر روی MIC قرار داشته و برابر با ۱۲۵ میکرولیتر است. اما بیوفیلیم نمونه‌ی ۹۸ و نقطه‌ی MIC و MBC ندارد. یعنی آنتی‌بیوتیک بر روی بیوفیلیم اثری نداشته است. در شکل می‌توانید نقطه‌ی MIC و MBC را مشاهده کنید (شکل ۲).



شکل ۲. نتیجه‌ی MIC باکتری پلانکتونی و بیوفیلیم.



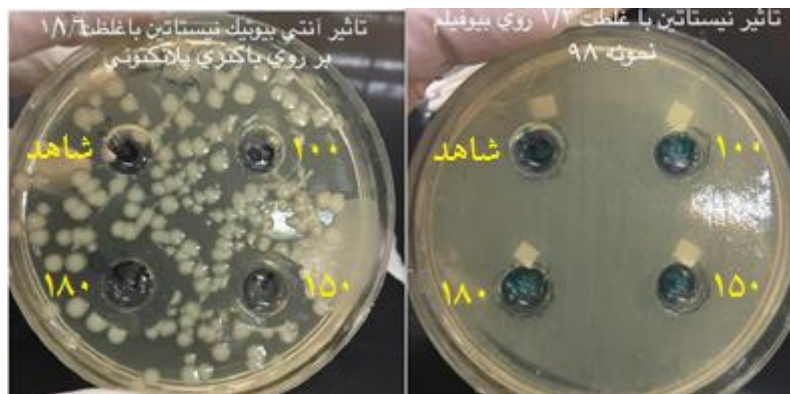
شکل ۳- نتیجه‌ی MBC حاصل از کشت لوله‌های شفاف باکتری پلانکتونی و چهار لوله‌ی آخر MIC بیوفیلم باکتری.

نتایج بررسی تأثیر آنتی‌بیوتیک نیستاتین بر روی باکتری پلانکتونی و بیوفیلم

همان‌طور که انتظار می‌رفت، آنتی‌بیوتیک نیستاتین بر روی بیوفیلم تأثیری نداشت و هاله‌ای اطراف چاهک‌ها ایجاد نشد اما همان آنتی‌بیوتیک نیستاتین با غلظت ۶/۲۵ درصد در باکتری پلانکتونی موثر بود و در اطراف چاهک هاله ایجاد کرد، مقدار هاله‌ها فاصله‌ی هاله‌ها تا چاهک اندازه‌گیری شده است (شکل ۴-۱۳). میزان قطر هاله در جدول ۳- نمایش داده شده است.

جدول ۳- میزان قطر هاله‌ی نمونه‌ی ۹۸ در اطراف دیسک آنتی‌بیوتیک نیستاتین.

مقدار (میکرولیتر)	نیستاتین قطر هاله (میلی‌متر)
۱۰۰	۲
۱۵۰	۴
۱۸۰	۵



شکل ۴- تأثیر نیستاتین بر روی بیوفیلم و باکتری آزاد نمونه‌ی ۹۸. (A) اثر نیستاتین با غلظت ۱/۲ و (B) اثر نیستاتین با غلظت ۱/۱۶. مقدار نیستاتین موجود در هر چاهک (۱۰۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ میکرولیتر) و چاهک‌های شاهد نمایش داده شده‌اند.

نتایج مطالعات آماری

بررسی‌های آماری داده‌های حاصل از نمونه‌های مورد نظر با نرم‌افزار Excel 2013 و به روش ANOVA: Two-factor انجام شد. طبق بررسی آماری میزان مقاومت نمونه‌ها (قطر هاله‌ی تشکیل شده در اطراف آنتی‌بیوتیک بر حسب میلی‌متر) به آنتی‌بیوتیک‌های فوق مشخص گردید که بین مقاومت ۱۸ نمونه‌ی فوق به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین در مقابل مقاومت به

آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P\text{-value} = ۰/۰۲۲$)؛ بدین معنی که هاله‌ی بزرگ‌تری که در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تشکیل شده است بیانگر حساسیت بیش‌تر باکتری *Escherichia coli* موجود در ۱۸ نمونه‌ی مورد مطالعه به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین می‌باشد. این تفاوت آماری بین مقاومت *Escherichia coli* درون نمونه‌ها به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مشاهده نشد. به این ترتیب می‌توان گفت مقاومت *Escherichia coli* حاصل از نمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین کم‌تر از مقاومت این باکتری به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین است. جدول ۴-۸ حاصل از عملیات آماری مربوط به مقاومت ۱۸ نمونه‌ی مورد مطالعه به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد.

جدول ۴- مقادیر آماری به دست‌آمده از تست ANOVA در مقایسه‌ی میزان مقاومت باکتری *Escherichia coli* موجود در ۱۸ نمونه‌ی مورد مطالعه به آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر.

F crit	P-value	F	MS	df	SS	منشأ مقایسه	آنتی‌بیوتیک‌های مورد مقایسه
۲/۲۷۱۸۹۳	۰/۰۴۶۲۷۲	۲/۳۱۵۷۳	۲۱۲/۹۴۱۲	۱۷	۳۶۲۰	سطرها	CP-AM
۴/۴۵۱۳۲۲	۰/۴۳۵۰۲۸	۰/۶۳۹۲۰۷	۵۸/۷۷۷۷۸	۱	۵۸/۷۷۷۷۸	ستون‌ها	
			۹۱/۹۵۴۲۵	۱۷	۱۵۶۳/۲۲۲	خطا	
۲/۲۷۱۸۹۳	۰/۰۰۱۳۲۳	۴/۶۹۷۱۶۱	۱۸۹/۲۶۸	۱۷	۳۲۱۷/۵۵۶	سطرها	AM-CFM
۴/۴۵۱۳۲۲	۰/۰۲۲۰۰۱	۶/۳۵۳۲۸۵	۲۵۶	۱	۲۵۶	ستون‌ها	
			۴۰/۲۹۴۱۲	۱۷	۶۵۸	خطا	
۲/۲۷۱۸۹۳	۰/۱۴۱۵۹۲	۱/۷۰۱۱۶۵	۲۲۴/۴۷۸۸	۱۷	۳۸۱۶/۱۳۹	سطرها	CFM-SXT
۴/۴۵۱۳۲۲	۰/۱۶۹۰۴۲	۲/۰۶۳۱۹	۲۷۲/۲۵	۱	۲۷۲/۲۵	ستون‌ها	
			۱۳۱/۹۵۵۹	۱۷	۲۲۴۳/۲۵	خطا	
۲/۲۷۱۸۹۳	۰/۱۷۵۹۳۲	۱/۵۸۴۴۷۸	۱۸۷/۸۵۱۳	۱۷	۳۱۹۳/۴۷۲	سطرها	SXT-GM
۴/۴۵۱۳۲۲	۰/۵۹۹۰۷۹	۰/۲۸۷۰۱۶	۳۴/۰۲۷۷۸	۱	۳۴/۰۲۷۷۸	ستون‌ها	
			۱۱۸/۵۵۷۲	۱۷	۲۰۱۵/۴۷۲	خطا	
۲/۲۷۱۸۹۳	۰/۰۱۳۶۲۴	۳/۰۴۴۵۸۸	۲۷۴/۴۷۰۶	۱۷	۴۶۶	سطرها	CP-CFM
۴/۴۵۱۳۲۲	۰/۳۹۲۳۵۴	۰/۷۷۰۳۱۸	۶۹/۴۴۴۴۴	۱	۶۹/۴۴۴۴۴	ستون‌ها	
			۹۰/۱۵۰۳۳	۱۷	۱۵۳۲/۵۵۶	خطا	
۲/۲۷۱۸۹۳	۰/۰۹۰۴۸۵	۱/۹۴۳۳۱۵	۲۸۵/۰۷۳۵	۱۷	۴۸۴۶/۲۵	سطرها	CP-SXT
۴/۴۵۱۳۲۲	۰/۵۰۹۲۰۲	۰/۴۵۴۶۴۹	۶۶/۶۹۴۴۴	۱	۶۶/۶۹۴۴۴	ستون‌ها	
			۱۴۶/۶۹۴۴	۱۷	۲۴۹۳/۸۰۶	خطا	
۲/۲۷۱۸۹۳	۰/۳۴۵۷۷۵	۱/۲۱۵۸۶۴	۱۷۲/۶۲۰۹	۱۷	۲۹۳۴/۵۵۶	سطرها	CP-GM
۴/۴۵۱۳۲۲	۰/۸۴۷۰۶۷	۰/۰۳۸۳۴۸	۵/۴۴۴۴۴	۱	۵/۴۴۴۴۴	ستون‌ها	
			۱۴۱/۹۷۳۹	۱۷	۲۴۱۳/۵۵۶	خطا	

۲/۲۷۱۸۹۳	۰/۱۱۹۱۵۱	۱/۷۹۴۱۰۴	۱۹۰/۵۱۸	۱۷	۳۲۳۸/۸۰۶	سطرها	AM-SXT
۴/۴۵۱۳۲۲	۰/۹۶۱۸۶۷	۰/۰۰۲۳۵۴	۰/۲۵	۱	۰/۲۵	ستون‌ها	
			۱۰۶/۱۹۱۲	۱۷	۱۸۰۵/۲۵	خطا	
۲/۲۷۱۸۹۳	۱/۸۳	۹/۰۸۷۷۷۱	۱۶۱/۷۳۸۶	۱۷	۲۷۴۹/۵۵۶	سطرها	AM-GM
۴/۴۵۱۳۲۲	۰/۲۲۳۲۱۳	۱/۵۹۸۲۳۷	۲۸/۴۴۴۴۴	۱	۲۸/۴۴۴۴۴	ستون‌ها	
			۱۷/۷۹۷۳۹	۱۷	۳۰۲/۵۵۵۶	خطا	
۲/۲۷۱۸۹۳	۰/۰۱۹۴۱۲	۲/۸۲۵۵۸۳	۱۷۶/۷۱۹	۱۷	۳۰۰۴/۲۲۲	سطرها	CFM-GM
۴/۴۵۱۳۲۲	۰/۱۹۵۱۰۲	۱/۸۱۹۲۰۸	۱۱۳/۷۷۷۸	۱	۱۱۳/۷۷۷۸	ستون‌ها	
			۶۲/۵۴۲۴۸	۱۷	۱۰۶۳/۲۲۲	خطا	

این نتایج بر اساس میزان هاله‌ی تشکیل شده در پلیت حاوی باکتری است؛ به این صورت که مقایسه‌ی میانگین داده‌های حاصل نیز نشان می‌دهد که میزان میانگین قطر هاله‌ها (میلی‌متر) به ترتیب از کم به زیاد مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریماکسازول (۱۵/۵۶)، آمپی‌سیلین (۱۵/۷۲)، جنتامایسین (۱۷/۵۰)، سیپروفلوکساسین (۱۸/۲۸) و سفکسیم (۲۱/۰۶) می‌باشد (شکل ۴-۱۴). نتایج مربوط به تعداد باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک نیز نشان داد که از بین ۱۸ نمونه‌ی مورد مطالعه که حاوی باکتری *Escherichia coli* هستند؛ حدود ۸ نمونه به آنتی‌بیوتیک کوتریماکسازول و ۸ نمونه به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین مقاومند.



شکل ۵- نمودار ستونی میانگین قطر هاله‌ی تشکیل شده در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی نمونه‌های مربوطه.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی انجام شده، از ۱۵۰ نمونه‌ی ادراری گرفته شده ۲۳ درصد نمونه‌ها مثبت بودند که از این تعداد ۱۸ درصد نمونه‌ها باکتری *Escherichia coli* بودند. همه‌ی باکتری‌های پلانکتونی *Escherichia coli* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین (CP)، آمپی‌سیلین (AM)، سفکسیم (CFM)، کوتریماکسازول (SXT)، جنتامایسین (GM) رفتار متفاوتی از خود نشان دادند که از بین این پنج آنتی‌بیوتیک سنجیده‌شده، بیش‌ترین مقاومت را با ۵۰ درصد برای آنتی‌بیوتیک

کوتریماکسازول (SXT) و کم‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیک مربوط به جنتامایسین (GM) با ۵/۵۵ درصد نشان داد. بعد از اتمام تشکیل بیوفیلم در میکروتیتر پلیت‌ها الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی را در روی بیوفیلم بررسی کردیم و به این نتیجه رسیدیم که بیوفیلم نسبت به آنتی‌بیوتیک کوتریماکسازول مقاوم است و میزان هاله‌ی تشکیل شده در اطراف آنتی‌بیوتیک‌ها کاهش پیدا کرده که این نشان دهنده‌ی این است که باکتری در حالت بیوفیلم مقاومت بیشتری دارد به همین دلیل در تمام سطوح باید از تشکیل بیوفیلم جلوگیری کرد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری پلانکتونی و بیوفیلم *Escherichia coli* نسبت به سوپرناتانت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، مقاوم می‌باشند. از تشکیل بیوفیلم باکتری *Escherichia coli* در محیط میکروتیتر پلیت و لوله‌های شیشه‌ای (روش لوله‌ای) به این نتیجه رسیدیم که نمونه‌ی ۹۸ در هر دو روش قادر به تشکیل مقدار زیادی بیوفیلم نسبت به نمونه‌های دیگر می‌باشد و میزان تشکیل بیوفیلم در روش میکروتیتر پلیت بیشتر از روش شیشه‌ای می‌باشد. که نشان دهنده‌ی این است که قدرت تشکیل بیوفیلم و چسبندگی آن به سطوح پلاستیکی بیشتر از سطوح شیشه‌ای است به همین دلیل باید در مراکز علمی بهداشتی درمانی بیشتر از تجهیزات شیشه‌ای استفاده کرد تا تشکیل بیوفیلم به حداقل ممکن برسد. نتایج بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیستاتین بر روی بیوفیلم *Escherichia coli* و باکتری آزاد *Escherichia coli* به این صورت بود که در باکتری پلانکتونی نسبت به رقت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک نیستاتین حساس می‌باشد و نقطه‌ی $MIC=1/25$ و نقطه‌ی MBC نیز بر روی نقطه‌ی MIC قرار دارد. در صورتی که بیوفیلم *Escherichia coli* نسبت به این آنتی‌بیوتیک کاملاً مقاوم بوده و نقطه‌ی MIC و MBC برای بیوفیلم وجود ندارد. در یک مطالعه در سال ۱۳۹۱ مشخص شد که مقاومت باکتری *Escherichia coli* به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین افزایش یافته است (عبدالهی خیرآبادی و همکاران، ۱۳۹۱). در مطالعه‌ی دیگری بیش‌ترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول دیده شد (تجویدی و همکاران، ۱۳۹۲). در یک مطالعه نیز از سفیکسم به عنوان آنتی‌بیوتیک مناسب برای درمان عفونت ادراری یاد شد که این بدین معنی است که حساسیت کمی نسبت به این آنتی‌بیوتیک مشاهده شده است (بنیادیان و همکاران، ۱۳۹۲). در چندین مطالعه نیز بیش‌ترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول دیده شد (ارباب‌سلمیانی و همکاران، ۱۳۹۲؛ تجویدی و همکاران، ۱۳۹۲). در دو مطالعه نیز عدم تأثیر پروبیوتیک‌ها بر رشد باکتری *Escherichia coli* تأیید شد (زرین‌فر و همکاران، ۱۳۹۵؛ فاضلی و همکاران، ۱۳۸۳). نکته‌ی مشترکی که در این مطالعات مشهود است مقاومت باکتری *Escherichia coli* نسبت به آنتی‌بیوتیک کوتریماکسازول (SXT) می‌باشد. هم‌چنین این مطالعه نشان می‌دهد که با گذر زمان مقاومت آنتی‌بیوتیکی رو به افزایشی قابل مشاهده است.

عبدالهی خیرآبادی و همکاران در مقاله بررسی الگوی مقاومت دارویی در سویه‌های *Escherichia coli* جدا شده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان ولیعصر شهرستان فسا که در سال ۱۳۹۱ در مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا به چاپ رسیده است به بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *Escherichia coli* نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده پرداخته است و نتایج، بیانگر افزایش مقاومت *Escherichia coli* به آنتی‌بیوتیک‌های ایمپنم و سیپروفلوکساسین در مقایسه با مطالعات پیشین است (عبدالهی خیرآبادی و همکاران، ۱۳۹۱).

احسان حیدری سورشجانی، مینا حیدری و عباس دوستی در مقاله‌ی خود بر روی اپیدمیولوژی عفونت و ادراری و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری *Escherichia coli* این نتایج را با هدف تعیین فراوانی عوامل باکتریایی ایجادکننده‌ی عفونت ادراری و الگوی حساسی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی *Escherichia coli* در مراجعین سرپایی بیمارستان امام علی (ع) شهر فرخ‌شهر گزارش کردند: از میان ۸۴۸ نمونه‌ی واجد شرایط، نتیجه آزمایش کشت ادرار ۷۴ نفر مثبت بود. باکتری

Escherichia coli شایع‌ترین باکتری‌های جداسازی شده بودند. بر اساس نتایج آنتی‌بیوگرام، بیش‌ترین موارد مقاومت به ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، نالیدیسیک اسید و سیپروفلوکسین بود (حیدری و همکاران، ۱۳۹۲).

منابع

۱. ارباب‌سلیمانی نازیلا، امینی زهرا، تاج‌بخش الهه، بررسی عامل اتصال و تشکیل بیوفیلم در اشریشیاکلی یوروپاتوژن جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری در استان سمنان، مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ۱۳۹۲، شماره ۶، صص ۳۳۶-۳۳۲.
۲. صدری مهسا، ارباب‌سلیمانی نازیلا، فرقانی‌فرد محمد مهدی، بررسی اثر ضد میکروبی و ضد اتصال لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی بر باکتری اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک (UPEC)، مجله‌ی زیست‌شناسی میکروارگانسیم‌ها، دامغان، ۱۳۹۵، دوره‌ی پنجم، شماره‌ی ۱۷، صص ۱۷۰-۱۵۹.
۳. امیرطالب رضا، بختیاری مریم، شیرازی محمد حسن، معماربانی مجتبی، مروری بر پاتوتیپ‌های اسهال‌زای اشریشیا کلی، مجله‌ی تشخیص آزمایشگاهی، تهران، ۱۳۹۴، شماره‌ی ۱۱۳ و ۱۱۴، صص ۲۳-۱۷.
۴. بنیادیان مجتبی، ابراهیمی عزیزالله، جمالی مرضیه، مطالعه‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های اشریشیا کلی جدا شده از شیر خام و پنیر غیرپاستوریزه و بررسی انتقال مقاومت به باکتری *E. coli* O2:K12، نشریه‌ی علوم درمانگاهی و دامپزشکی ایران، شهر کرد، ۱۳۹۱، دوره‌ی هفتم، شماره‌ی ۱، صص ۲۵-۷۰.
۵. تیبانیان حمید و یوسفی ثابت‌مژده بهجت، بررسی و مقایسه‌ی فاکتورهای استرس ORS و pH بر تشکیل بیوفیلم و فرم پلانکتونی *E. coli* O157:H7، مجله‌ی تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی-مولکولی، دوره‌ی ۵، شماره‌ی ۱۸، صص ۱۵-۲۲.
۶. تجویدی ندا، مهبد امیر سید علی، حسینی‌شکوه سید جواد، ناصح ایمان، تجویدی محمد امین، بررسی الگوی مقاومت خارج‌دنی باکتری اشریشیاکلی جدا شده از عفونت‌های ادراری در سطح شهر تهران، مجله‌ی علمی پژوهشی علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، سال یازدهم، تهران، ۱۳۹۲، شماره‌ی ۴، صص ۳۳۴-۳۳۰.
۷. جلیلیان سارا، رخ‌بخش زمین فرخ، بررسی تشکیل بیوفیلم در اشریشیاکلی ایزوله شده از نمونه‌های کلینیکی در شهرستان زاهدان، مجله‌ی علوم پزشکی پارس، زاهدان، ۱۳۹۶، دوره‌ی ۱۵، شماره‌ی ۱، صص ۴۲-۳۶.
۸. حیدری سورشجانی احسان، حیدری مینا، دوستی عباس، اپیدمیولوژی عفونت ادراری و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی اشریشیاکلی مراجعین به بیمارستان امام علی (ع) فرخ‌شهر در استان چهارمحال بختیاری، مجله‌ی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ۱۳۹۲، دوره‌ی ۱۵، شماره‌ی ۲، صص ۱۵-۹.
۹. حمیدی‌فراهانی رامین، تاجیک احمد رضا، نوری‌فرد مهتاب، کشاورز اکبر، تقی‌پور نیلوفر، حسینی‌شکوه سید جواد، بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی اشریشیاکلی در نمونه‌ی کشت ادرار آزمایشگاه مرکز تحقیقات ۶۶۰ ارتش در سال ۱۳۸۷-۸۸، مجله‌ی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، تهران، ۱۳۹۱، شماره‌ی ۱، صص ۴۹-۴۵.
۱۰. درمنش بنفشه، میرنژاد رضا، خداوردی داریان ابراهیم، ممتاز حسن، یاحقی عماد، صفی‌پور دهکردی فرهاد، پیله‌ورزاده مطهره، بررسی فاکتورهای ویروانس، تعیین سروگروپ‌ها و مقاومت پادزیستی سویه‌های اشریشیا کلی یوروپاتوژن

- جداشده از کودکان مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه، مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران، تهران، ۱۳۹۲، سال هفتم، شماره ۲، صص ۳۹-۲۷.
۱۱. زرین فر نادر، ولیخانی مریم، صادقی بهمن، صوفیان معصومه، اکبری مجید، بررسی تأثیر پیش‌گیرانه کپسول پروبیوتیک (لاکتوکر) بر عفونت ادراری بیماران تحت کاتتریزاسیون ادراری در بخش‌های مراقبت ویژه مرکز آموزشی و درمانی ولی عصر (عج) اراک، اراک، ۱۳۹۵، شماره ۱۱، صص ۵۶-۴۷.
۱۲. سوادکوهی براری رحیم، سرخی هادی، پورنصرالله محمد، بیژنی علی، بابازاده نسرین، بالغی دماوندی صدیقه، مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های مولد عفونت ادراری در بیماران بستری در بیمارستان کودکان امیرکلا در طی سال ۱۳۸۹-۱۳۹۰، بابل، ۱۳۹۳، مجله‌ی دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره ۱۵، شماره ۵، صص ۸۹-۹۴.
۱۳. صادقی فرد نور خدا، صادقیان سیاوش، دانشیار ابراهیم، رنجبر رضا، شیرازی محمد حسن، اتیولوژی و مقاومت ضد میکروبی عفونت ادراری بدون علامت در خانم‌های باردار مراجعه‌کننده به مراکز بهداشتی درمانی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی همدان، بیماری‌های عفونی و گرمسیری، همدان، ۱۳۸۵، شماره ۳۶.
۱۴. فاضلی علی، قاسمیان صفایی حاجیه، میرنژاد رضا، بررسی کاهش کلونیزاسیون اشرشیاکلی انترتوکسیژنیک توسط پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس کازئی) در موش آزمایشگاهی، شهرکرد، ۱۳۸۳، دوره ۶، شماره ۱، صص ۳۳-۲۶.
۱۵. عبداللهی خیرآبادی سارا، نجفی‌پور سهراب، کفیل‌زاده فرشید، عبداللهی عباس، جعفری سمیه، مروج علی، بررسی الگوی مقاومت در سویه‌های اشرشیاکلی جدا شده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان ولی عصر شهرستان فسا، مجله‌ی دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ۱۳۹۱، سال دوم، شماره ۴، صص ۲۷۸-۲۷۳.
۱۶. عطایی نعمت‌الله، صفائیان بارانک، مدنی عباس، اصفهانی سید طاهر، عطائی فاطمه، ارزیابی تغییرات پارانشیم کلیه با استفاده از اسکن DMSA در کودکان مبتلا به پیلونفریت حاد و رابطه‌ی آن با برخی پارامترهای بیولوژیک، مجله‌ی دانشکده‌ی پزشکی، تهران، دوره ۶۷، شماره ۳، ۱۳۸۸، صص ۱۲۵-۱۳۱.
۱۷. علیرضایی عاطفه و زابلی فاطمه، بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* و تأثیر برخی آنتی‌بیوتیک‌ها و بیوسایدهای صنعتی استفاده شده در ایران برای کنترل بیوفیلم این باکتری‌ها، دومین همایش علمی پژوهشی زیست‌شناسی و علوم باغبانی ایران، انجمن علمی توسعه و ترویج علوم و فنون بنیادین، تهران، ۱۳۹۴، صص ۹-۱.
۱۸. محمدزاده عبدالمجید، شریفی آرام، بیوفیلم باکتریایی و مکانیسم‌های مهار آن با تکیه بر خواص ضد بیوفیلیمی ترکیبات گیاهی، مجله‌ی علمی-پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی، تهران، ۱۳۹۵، سال پنجم، شماره ۱، صص ۷۱-۸۱.
۱۹. مدنی سیدحمید، خزاعی صدیقه، کنانی مالک، شاهی مریم، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی اشرشیاکلی در نمونه‌های کشت ادرار بیمارستان امام رضا کرمانشاه، فصلنامه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ۱۳۸۷، سال دوازدهم، شماره ۳، صص ۲۹۵-۲۸۷.
۲۰. موثق غازانی محمد حسین، کریم گیتی، احمدزاده علیرضا، مطالعه تشکیل بیوفیلم توسط باکتری اشرشیا کلی سروتیپ O111 بر روی سطوح استیل زنگ نزن و لاستیک تماسی با شیر، مجله علوم دامپزشکی ایران، تهران، ۱۳۸۶، دوره ۳، شماره ۳، صص ۲۲۱-۲۲۶.

۲۱. میرزایی حمید، جوادی افشین، غیائی خسروشاهی علی، مطالعه‌ی تأثیر رشد توامان پروبیوتیک‌ها (لاکتوباسیلوس کازئی، بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم و بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم) و اشیرشیاکولای در شیر استریل تجارتي، مجله‌ی علوم دامپزشکی ایران، تهران، ۱۳۸۶، سال چهارم، شماره‌ی ۳، صص ۲۲۰-۲۱۵.
۲۲. نادری عطیه، بررسی اثر آنتاگونیستی سه نوع پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس) بر روی *Escherichia coli* های عامل عفونت ادراری، اولین همایش ملی پروبیوتیک و محصولات فراویژه، مرکز علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ۱۳۸۹، صص ۱-۲.

23. **Abedi D., Feizizadeh S., Akbari V., Jafarian-Dehkordi A.** 2013. In vitro antibacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* on *Escherichia coli*. *Research in pharmaceutical sciences*. 8(4): 260-268.
24. **Abbott Sharon L., O'Connor Jennifer, Robin Tom, Zimmer Barbara L., Janda Michael.** 2003. Biochemical properties of a newly described *Escherichia* species, *Escherichia arbertii*. *Journal of clinical microbiology*. 41(10): 4852-4854.
25. **Adukauskiene D., Cicinskaite I., Vitkauskiene A., Macas A., Tamosiunas R., Kinderyte A.** 2006. Hospital-acquired urinary tract infections. *Medicina*. 42(12): 957-964.
26. **Al-Badr Ahmed, Al-Sahikh Gadeer.** 2013. Recurrent urinary tract infections management in women. *Sultan qaboos university medical journal*. 13(3): 359-367.
27. **Almanovici Trestioreanu A, Green H, Paul M, Yaphe J, Leibovici L.** 2010. *Zalmanovici Trestioreanu, Anca, ed. Cochrane Database of Systematic Reviews. The Cochrane database of systematic reviews*. 10 (10): 1-89.
28. **Amdekar, S. Singh, V. Singh, DD.** 2011. Probiotic therapy: immunomodulating approach toward urinary tract infection. *Current microbiology*. 63 (5): 484-90.
29. **Anas Mami, Kerfouf Ahmed, Mebrouk Kihal.** 2014. Study of antimicrobial and probiotic effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from Raw Goat's milk from the region of Western Algeria. *International journal of sciences: Basic and applied research*. 13(1): 18-27.
30. **Arkam Mohammed, Shahid Mohammed, Khan U Asad.** 2007. Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in J N M C hospital Aligarh, India. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 6(4): 1-7.
31. **Astal ZE.** 2005. Increasing ciprofloxacin resistance among prevalent urinary tract bacterial isolates in the Gaza Strip. *Singapore medical journal*. 46(9):457-59.
32. **Basil Mohammed Hamzah, Gomroki Fatemeh, Malla Sudhakar, Kumar Senthil.** 2014. Amplification of *ndvB* gene and biofilm formation studies in *Escherichia coli*. *European journal of experimental biology*. 4(6):65-70.
33. **Battistuzzi FU, Feijao A, Hedges SB.** 2004. A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC evolutionary biology*. 4: 44.
34. **Beloin Christophe, Agnès Roux, Jean-Marc Ghigo.** 2008. *Escherichia coli* biofilms. *Current top microbiology immunology*. 322: 1-20.

35. **Chen JQ, Zhang HT, Hu MH, Tang JG.** 1995. Production of human insulin in an *E. coli* system with Met-Lys-human proinsulin as the expressed precursor. *Applied biochemistry and biotechnology*. 55(1): 5-15.
36. **Ciofu, O. Mandsberg, LF. Wang, H.; Hoiby, N.** 2012. Phenotypes selected during chronic lung infection in cystic fibrosis patients: implications for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. *FEMS immunology and medical microbiology*. 65(2): 215-225.
37. **Clements Abigail, Young Joanna C., Constantinou Nicholas, Frankel Gad.** 2012. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut microbes*. 3(2): 71-87.
38. **Colgan R. Williams M.** 2011. Diagnosis and treatment of acute uncomplicated cystitis. *American family physician*. 84 (7): 771-7766.
39. **Cornelis P.** 2000. Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Current opinion biotechnology*. 11(5): 450-454.
40. **De Francesco MA, Giuseppe R, Laura P, Riccardo N, Nin M.** 2007. Urinary tract infections in Brescia, Italy: Etiology of uropathogens and antimicrobial resistance of common Uropathogens. *Medical science monitor*. 13(6):136-144.
41. **Donlan RM, Costerton JW.** 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology review*. 15: 167-193.
42. **Eves F J., Rivera, N.** 2010. Prevention of urinary tract infections in persons with spinal cord injury in home health care. *Home healthcare nurse*. 28 (4): 230-41.
43. **Eng Shu-Kee, Pusparajah Priyia, Ab Muyalib Nurul-Syakima, Ser Hooi-Leng, Chan Kok-Gan, Lee Learn-Han.** 2015. Salmonella: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in life science*. 8(3): 284-293.
44. **Flemming, HC. Wingender, J.** 2010. The biofilm matrix. *Nature review microbiology*. 8: 623-633.
45. **Walters, MC. Roe, F. Bugnicourt, A. Franklin. MJ. Stewart. PS.** 2003. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 47(1): 317-323.
46. **Watnick, P. Kolter, R.** 2000. Biofilm, city of microbes. *Journal of bacteriology*. 182: 2675- 2679.
47. **Woodford, HJ. George, J.** 2011. Diagnosis and management of urinary infections in older people. *Clinical medicine (London, England)*. 11 (1): 80-3.