مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الصحية المجلد (39) العدد (3) 2017
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (39) No. (3) 2017

Study of biofilm formation in clinical bacterial isolates of urinary tract infection.

Dr. Rawaa Souhil Al-kayali*

(Received 29 / 3 / 2017. Accepted 1 / 6 / 2017)

□ ABSTRACT □

The present study was carried out to evaluate Biofilm production among urinary tract infection. A total of 53 bacterial isolates were included in the study. The identification and antibiotic susceptibility testing of all the isolates was done as per the standard laboratory protocol. Biofilm production was detected by adherence to test tubes. Among 53 isolates *Escherichia coli* 39.6%, *Klebsiella pneumoniae* 24.5%, *Citobacter spp.*15%, *Pseudomonas spp* 9.4 % and Coagulase- negative (CoN) *Staphylococcus* 11.3%. Considering the antibiotic susceptibility pattern 47.2% of isolates were multidrug resistant. Among MDR strains, 80% of isolates were found to be biofilm producers. Microbial biofilms have been associated with a variety of persistent infections which respond poorly to conventional antibiotic therapy. Hence detection of biofilms for all the isolates on a routine basis will help to choose effective treatment to eradicate bacteria and prevent further antibiotic resistance.

Key words: Urinary tract infection, Multidrug resistant, Biofilm

* **Assistant Professor-Department of Biochemistry and Microbiology- Faculty of Pharmacy- Aleppo University**

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الصحية المجلد (39) العدد (3) 2017
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (39) No. (3) 2017

دراسة تكون الغشاء الحيوي في العزلات الجرثومية السريرية المسببة لإنتانات الجهاز البولي

د. روعة سهيل الكيالي*

(تاريخ الإيداع 29 / 3 / 2017. قُبِل للنشر في 1 / 6 /2017)

□ ملخّص □

هدفت هذه الدراسة لتقييم قدرة الجراثيم المعزولة من إنتانات الجهاز البولي على تكوين الغشاء الحيوي . شملت الدراسة 53 عزلة تم تعريفها واختبار حساسيتها للمضادات الحيوية بالطرائق المعتمدة. تم اختبار قدرة العزلات على تكوين الغشاء الحيوي باستخدام طريقة الالتصاق على الأنبوب. بلغت نسبة العصيات القولونية المعزولة 39.6% والكليبسيلا الرئوية 24.5% و الستروباكتر 15%و السيدوموناس 9.4% في حين بلغت نسبة عزلات المكورات العنقودية سلبية المخثراز 11.3%. بلغت نسبة العزلات المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية 47.2% ، كان منها 80% مكوناً للغشاء الحيوي. إن تكوين الأغشية الحيوية من قبل الجراثيم الممرضة ارتبط بالعديد من الأمراض المزمنة التي لا تستجيب للعلاج التقليدي بالمضادات الحيوية. إن تشخيص قدرة العزلات على تكوين الغشاء الحيوي بشكل روتيني سوف يساعد على اختيار العلاج الفعال للقضاء على هذه الجراثيم ومنع انتشار المقاومة للمضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية: انتانات الجهاز البولي، مقاومة متعددة للمضادات الحيوية، الغشاء الحيوي

* مدرسة– قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة، كلية الصيدلة، جامعة حلب

مقدمة:

وصف العالم روبرت كوخ الجراثيم بأنها كائنات ذات خلية واحدة تعيش منفردة ، ولكن هذا الوصف لم يفسر الكثير من الظواهر المتعلقة بالجراثيم، حيث شاهد العالم لفينهوك تجمعات للجراثيم ملتصقة بالأسنان باستخدام مجهره البدائي ووصفها بالقشرة scurf. في أوائل القرن العشرين وصف العديد من العلماء تجمعات للجراثيم محاطة بمادة لزجة في البيئة الطبيعية متكونة على الصخور في المجاري المائية وفي قيعان البحيرات، وهو ما بات يعرف الآن بالأغشية الحيوية أو Biofilm [1، 2]. في عام 1977 تم ربط وجود الأغشية الحيوية بالأمراض المزمنة عندما تم عزل تجمع للزائفة الزنجارية من مريض قشع يعاني من التليف الكيسي (cystic fibrosis) وأطلق عليه لأول مرة المصطلح العلمي Biofilm [3] .

يعرف البيوفيلم أو الغشاء الحيوي بأنه تجمع بكتري (مكون من نوع واحد أو عدة أنواع) يلتصق بالسطوح الرطبة المختلفة (الحيوية والجامدة) ويحاط بمادة لزجة مخاطية تسمى الملاط matrix [4، 5].

يأخذ هذا التجمع أو التركيب شكل ثلاثي الأبعاد تشبه أشكاله " شكل المشروم " يحتاج إلى وجود أسطح يلتصق بها، كما يوجد داخله قنوات بين النموات الجرثومية لإيصال الماء والغذاء للخلايا الداخلية [5، 6]. تبدأ البكتريا بإنشاء هذا التجمع كاستجابة للظروف البيئية المحيطة بها كتوفر الغذاء والأوكسجين. تلعب السياط دوراً مهماً في المرحلة البدئية لتشكل الفيلم الحيوي، حيث تفيد بتقريب البكتريا من السطوح اللازمة والتصاقها بها ومن ثم تكوين نمو جرثومي أحادي الطبقة. إن التصاق الجراثيم ذو أهمية كبيرة حيث يحمي الخلايا الجرثومية من تأثير إزالتها بتأثير اللعاب والدموع أو المواد المخاطية . كما يحميها من الانجراف مع تيار الدم أو البول. بعد ذلك تبدأ الخلايا بالتكاثر وتكون نموات متعددة الطبقات على شكل عناقيد وتحيط نفسها بالملاط المكون من عديدات السكاكر وبعض البروتينات وحموض نووية ومواد أخرى [7]. يلصق الملاط البكتريا مع بعضها البعض وعلى السطح كما يحمي من تأثيرات المضادات الحيوية والمواد السامة الأخرى [4]. يظهر الشكل النهائي للفيلم الحيوي على شكل مستعمرات صغيرة تشبه فطر المشروم يفصل بينها قنوات لإيصال الماء والمواد المغذية للخلايا الداخلية. إن اكتشاف ظاهرة البيوفيلم وجهت أنظار العلماء لظاهرة فريدة في عملية تنظيم النسخ والتعبير المورثي عند البكتيريا أثناء عملية تحولها من نمط العيش منفردة إلى العيش ضمن البيوفيلم [7].

تتشكل هذه الأفلام الحيوية داخل الجسم الحي، وقد لوحظ وجودها على أدوات القثطرة وعلى العدسات اللاصقة والمفاصل الصناعية وعلى الأجهزة المنظمة لضربات القلب بالاضافة إلى تشكلها على السطوح الداخلية للأمعاء والرئة وعلى شكل لويحات سنية [2]. تتسبب هذه الأغشية الحيوية بالعديد من الانتانات البولية و التنفسية والتهابات شغاف القلب، ولقد أرجعت الأبحاث الحدثية تعنيد الإنتانات المزمنة على العلاج إلى الخمج بالأفلام الحيوية وذلك في مختلف أنحاء الجسم [8]. تزيد مقاومة الخلية الجرثومية الداخلة في تركيب الفيلم الحيوي للمضادات الحيوية بنسبة تتراوح بين عشرة إلى ألف ضعف مقارنة بمقاومة نفس الخلية الجرثومية بشكلها الحر ممايجعلها معندة على العلاج [9]. يصّعب أيضاً إزالة الأفلام الحيوية والتخلص منها بفعل دفاعات الجسم المناعية بسبب صعوبة تمييز وجودها خلف الملاط السكري ولذلك فهي تشكل في الجسم الحي مصدراً متجدداً لإعادة العدوى والخمج [10]،. لقد اقترحت عدة آليات لتفسير ازدياد مقاومة جراثيم الغشاء الحيوي للمضادات الحيوية منها ضعف نفوذية المضادات الحيوية عبر الملاط السكري وبطء معدل استقلاب الخلايا البكترية ونموها مما يجعلها غير حساسة لغالبية المضادات الحيوية التي تستهدف الجدار الخلوي والفعاليات الحيوية في الخلية

[11، 12] . كما أكدت الأبحاث أن التبادلات الوراثية بين الجراثيم تكون بمستوى أعلى مما يسمح باكتساب غالبية الجراثيم المشاركة في الغشاء الحيوي للمورثات المقاومة للمضادات الحيوية [13،1]. وعلاوة على ذلك، هناك دلائل مؤكدة على أن الجراثيم في الغشاء الحيوي تتطور لأنماط شكلية متعددة تدعى المتغيرات "variants"، وقد سبق بيان هذه الظاهرة "فرضية التأمين" الذي يفترض إن وجود تنوع في صفات الأفراد في نفس المجموعة يزيد من فرص المجموعة ككل على النمو والبقاء. إن اكتشاف ظاهرة البيوفيلم وجهت أنظار العلماء لظاهرة فريدة في عملية تنظيم النسخ والتعبير المورثي عند البكتيريا أثناء عملية تحولها من نمط العيش منفردة إلى العيش ضمن البيوفيلم [14].

أهمية البحث وأهدافه

أهمية البحث

تعتبر انتانات الطرق البولية واحدة من أهم أسباب الوفيات عبر العالم التي تصيب كل الأعمار وخاصة النساء. لقد قدر بأن 40% من النساء تقريباً قد أصيبوا مرة واحدة بالانتانات البولية في حياتهم وأن 20% من الانتانات قد انتكست وخاصة عند النساء الصغيرات بشكل اساسي، إن معاودة الانتان قد يرجع إلى العدوى بالجراثيم المكونة لأغشية حيوية في المثانة أو حتى في المهبل [16،15]. وحيث أنه لا توجد أية معلومات أو أبحاث سابقة في سوريا عن تقييم قدرة عزلات الجهاز البولي على تكوين الأغشية الحيوية، لذلك أجري هذا البحث.

هدف البحث:

هدف هذا البحث إلى:

- معرفة أكثر الأنواع الجرثومية المعزولة من إنتانات الجهاز البولي في مستشفى جامعة حلب
- تقييم مدى حساسيتها للمضادات الحيوية المختلفة المستخدمة بالعلاج.
- تقييم إمكانية هذه العزلات المسببة لإنتانات الجهاز البولي على تكوين الغشاء الحيوي
- تقييم علاقة تكوين الغشاء الحيوي لدى العزلات بالمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية.

طرائق البحث ومواده:

العزلات الجرثومية

تم الحصول على العزلات الجرثومية المسببة للانتانات البولية من مخبر الجراثيم – مستشفى جامعة حلب خلال شهري 10و11 من عام 2016. تم تعريف العزلات بتنميتها على الأوساط الانتقائية والتفريقية اللازمة ودراسة شكل المستعمرات الناتجة (وسط ماكونكي، وسط EMB، وسط كليغلر، وسط السترات، وسط MIU). بالإضافة إلى فحصها مجهرياً بعد تلوينها بصبغة غرام وإجراء الاختبارات الكيميائية الحيوية اللازمة. حفظت العزلات في الوسط المغذي السائل المزود بالغليسيرول 30%، بدرجة حرارة –20 م لحين إجراء التجربة.

اختبار التحسس للمضادات الحيوية

تم اختبار حساسية العزلات الجرثومية لمضادات حيوية تتبع لخمسة مجموعات رئيسية باستخدام طريقة الانتشار من الأقراص (كيربي– باور) تبعاً لارشادات NCCLS [17] وهي: أموكسيسيللين– حامض الكلافيولونيك(20/10 µg)، بيبراسيلين– تازوباكتام (30 µg)، السيفوتاكسيم (30 µg) سيفبودواكسيم(30 µg)،

سيفوروكسيم(30 µg)، سفترياكسون (30 µg)، سيفيبم (30 µg)، نوروفلواكساسين (10µg)، إيميبينيم (10 µg)، سيبروفلوكساسين(10 µg) ،أميكاسين (10 µg)، نتروفورانتوين (300 µg)، ترايميثوبريم–سلفاميتواكسازول (23.75/1.25 µg) . اعتبرت العزلات متعددة المقاومة للمضادات الحيوية (MDR) Multi Drug resistantإذا أظهرت مقاومة لثلاثة من المضادات كلا منها ينتمي لمجموعة مختلفة [18].

الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي

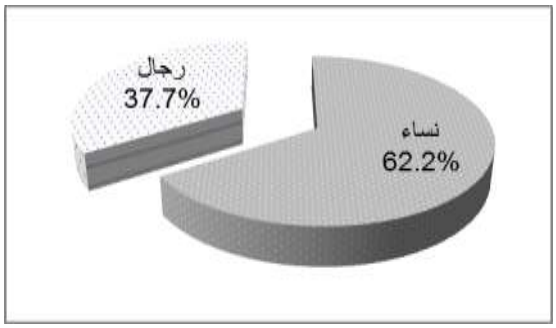
تم الكشف عن الأغشية الحيوية باستخدام طريقة الالتصاق على الأنبوب. تعتبر هذه الطريقة نوعية و بسيطة وغير معقدة كما أنها ليست مكلفة و تعطي نتائج موثوقة مشابهة لنتائج المجهر الإلكتروني. يعتمد مبدأ هذه الطريقة على تحري التصاق السلالات المدروسة على الأنابيب الزجاجية نتيجة تكوينها للغشاء الحيوي تبعاً للخطوات المذكورة:

يوضع 10 µl من المزرعة الجرثومية الجرثومية بعمر 18–24 سا وبتركيز (0.5 McFarland) في أنابيب زجاجية تحوي 10 مل من مرق موللر هنتون ثم تحضن الأنابيب بدرجة حرارة 37 مئوية في شروط هوائية لمدة 24 ساعة. بعد الحضانة تفرغ الأنابيب من المرق والجراثيم وتغسل بمحلول وقاء الفوسفات (درجة الحموضة 7.3) ثم تجفف. وبعد ذلك تلون الأنابيب الفارغة بالبنفسجية المبلورة (0.1٪) لمدة خمس دقائق. بعدها تغسل الصبغة الزائدة بالماء المقطر وتجفف الأنابيب بوضع مقلوب. تسجل النتيجة ايجابية وتعتبر العزلة الجرثومية المدروسة مكونة للغشاء الحيوي عندما يشاهد بالعين المجردة وجود طبقة ملونة على الجدار وفي الجزء السفلي من الأنبوب. إن وجود حلقة ملونة فاصلة بين جزئي السائل والهواء في الأنبوب يسجل على أنه نتيجة سلبية أي عدم تشكيل غشاء حيوي [19].

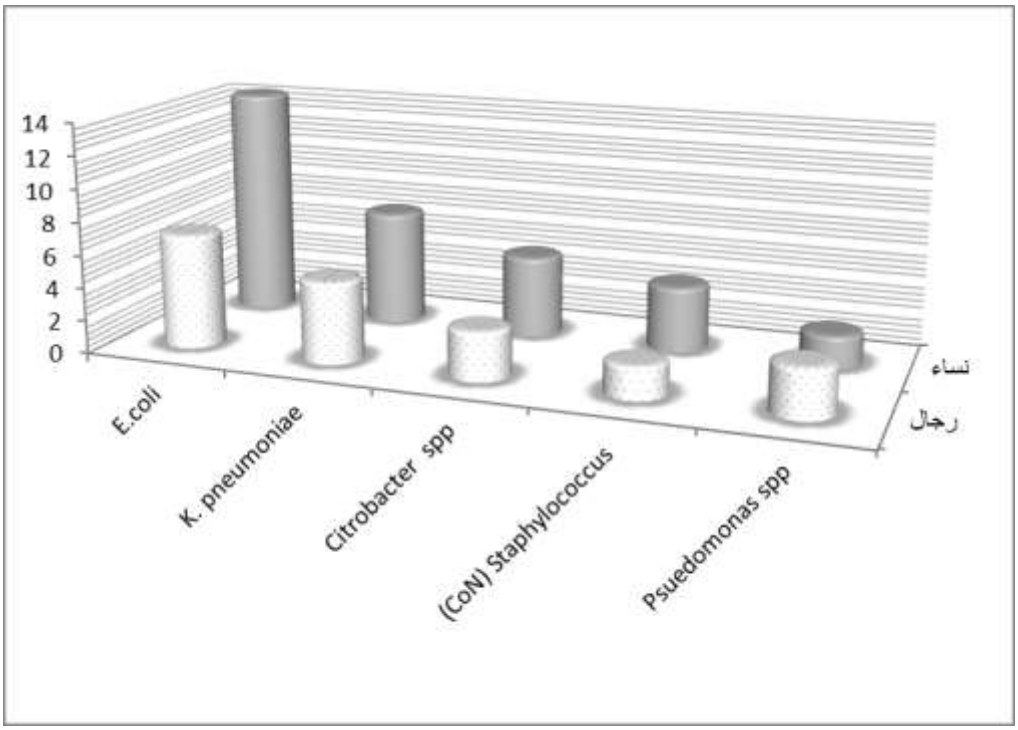
النتائج والمناقشة:

تم الحصول على 53 عزلة جرثومية مسببة للإنتانات البولية خلال شهرين، عزل منها 33 (62.2 %) من النساء بمقابل 20 عزلة (37.7 %) من الرجال الشكل (1) . كانت غالبية العزلات سلبية غرام (88.7 %) ، بمقابل 6 (11.3%) جراثيم ايجابية غرام ممثلة بنوع المكورات العنقودية سلبية المخثراز. كانت أكثر الأنواع الجرثومية تسبباً بالإنتانات البولية هي العصيات القولونية *E.coli* وبلغ عددها21 عزلة (39.6%)، تلته الكليبسيلا الرئوية 13 عزلة (24.5 %) فالستروباكتر 8 (15%) ثم *Psuedomonas spp* 5 عزلات (9.4%).

إن ظاهرة ارتفاع معدل إصابة النساء بالإنتانات البولية مقارنة بالرجال قد ذكر بالعديد من الأبحاث السابقة ويرجع ذلك إلى اختلاف البنية التشريحية والفيزيولوجية للجهاز البولي الخارجي بين النساء والرجال، وهو ما يتوافق مع دراسة عبدالله وآخرون (2011) حيث بلغت نسبة العزلات الجرثومية من النساء المريضات (66%) مقابل (34%) من الرجال، وكانت العصيات القولونية أكثر الجراثيم تواتراً وتلتها الكليبسيلا الرئوية بنسب (13.7%، 15%) على التوالي [20].



الشكل (1): توزع العزلات بين المصابين بالانتانات البولية



الشكل(2): توزع العزلات بحسب النوع الجرثومي على الرجال والنساء

تشابهت نتائج الدراسة الحالية مع ما وصلت إليه دراسة Alves وآخرون (2014) و دراسة فاتيما وآخرون (2015) حيث كانت نسبة العصيات القولونية المعزولة (38%، 64%) والكليبسيلا الرئوية (22%، 21%) على التوالي. من جهة أخرى سجلت نتائج الدراسات الثلاثة السابقة الحالية وجود جراثيم *Proteus* و*Enterobacter* و*Acinetobacter* كمسببات للانتانات البولية وهو ما يختلف مع نتائج الدراسة الحالية [19، 21].

أظهر اختبار التحسس للمضادات الحيوية بأن غالبية العزلات كانت مقاومة للمضادات الحيوية المختبرة الجدول (1)، حيث كان تأثير مجموعة السيفالوسبورينات متوسطاً وتراوح بين 22.6% إلى 41.5 %. في حين كانت مضادات الفلوروكينولونات أفضل تأثيراً وتراوح تحسس العزلا ت بين 54.7 % و73.6 %. يعتبرالمضاد الحيوي نتروفورانتوين المضاد النوعي للانتانات البولية ولكنه لم يؤثر إلا على 64.2 % من العزلات وكذلك لم

يؤثرالمضاد ترايميثوبريم–سلفاميتواكسازول إلا على ربع العزلات تقريباً. كان الايبينيم هو الأفضل تأثيراً حيث كانت 94.3 % ، يليه الأميكاسين والنوروفلوكساسين (73.6 %).

بلغ عدد العزلات متعددة المقاومة للمضادات الحيوية MDR 25 عزلة (47.2 %) ، وكان معدل انتشار المقاومة المتعددة في عزلات المكورات العنقودية سلبية المخثراز هو الأكبر (60%)، تلتها العصيات القولونية (52.4 %) فالكليبسيلا الرئوية (46.2 %) في حين كانت النسبة الأقل عندعزلات الستروبكتر(37.2%).

في دراسة Khawcharoenporn (2013) التي أجريت في شيكاغو بأمريكا، لوحظ انتشار محدود لمقاومة الجراثيم للمضادات الحيوية المدروسة حيث تراوحت حساسية العزلات للسفالوسبورينات ما بين 90% الى 97%، فيما ثبط الايرتابينيم Ertapenem كل العزلات المدروسة. و ثبط الأميكاسين و النتروفورانتوين الليفوفلوكساسين 99% و86% و83% من العزلات على التوالي. كما بلغ عدد العزلات المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية MDR 83 عزلة من إجمالي 451 (19%)، وشكلت العصيات القولونية 76% منها وتلتها الكليبسيلا الرئوية بنسبة 5% [22]. ومن جهة أخرى كانت نسبة عزلات MDR (53%) في دراسة فاتيما وآخرون (2015) [21]. أما في دراسة Eshetie و آخرون (2015) بأثيوبيا فقد بلغت عزلات MDR 159عزلة من إجمالي 183 عزلة (86%) وكانت نسبة الانتشار الأكبر بين عزلات الكليبسيلا الرئوية 95.5% وتلتها العصيات القولونية بنسبة 92.9% [23].

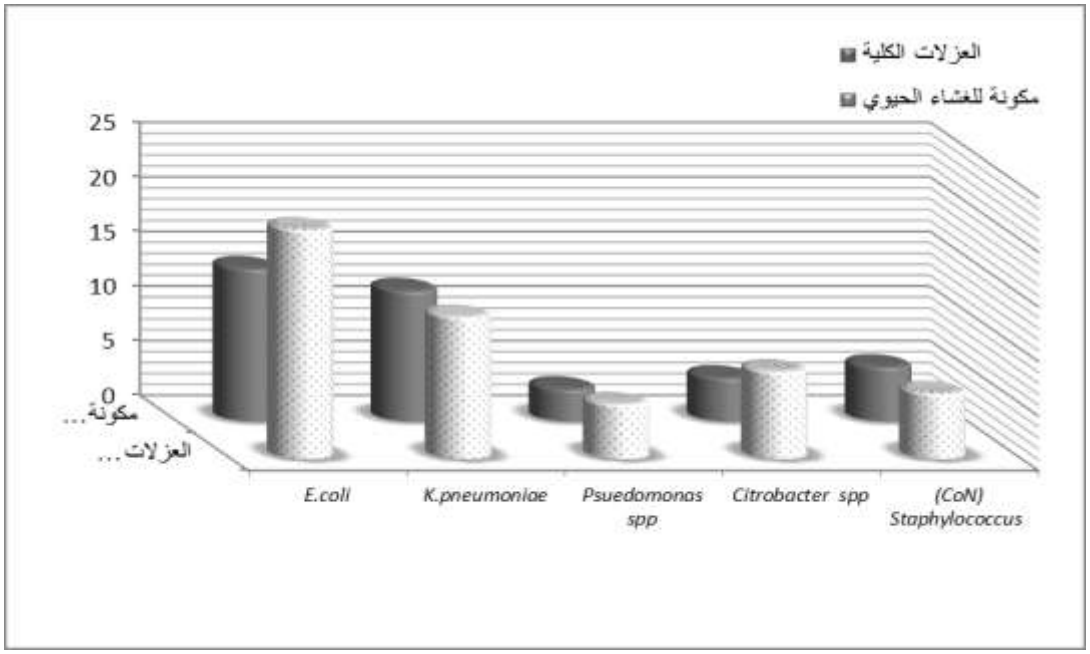
أظهرت نتائج اختبار الالتصاق على الأنبوب بأن 38 عزلة (71.7%) كانت مكونة للغشاء الحيوي وكانت عزلات الكليبسيلا الرئوية هي الأكثر تكويناً للغشاء الحيوي بنسبة بلغت (92.5 %)، تلتها المكورات العنقودية سلبية المخثراز (83.3 %) ثم العصيات القولونية (66.7%). في حين بلغت نسبة تكوين الغشاء الحيوي في *Psuedomonas* والستروباكتر و(37.5% و 40%) على التوالي الشكل (3).

وقد لوحظ اختلاف في نسب توزع العزلات المكونة للغشاء الحيوي مابين العزلات التي مصدرها النساء وتلك التي عزلت من الرجال كما يظهر في الجدول (2) مما يمكن عزوه إلى تكرر الانتانات الناكسة عند النساء أكثر منها عند الرجال [15].

جدول (1): نسبة العزلات الحساسة للمضادات الحيوية

المضادات الحيوية	العزلات الجرثومية					
	E.coli (n= 21)	*K.pneumoniae* (n=13)	*Psuedomonas spp* (n=5)	*Citrobacter spp* (n=8)	*Staphylococcus* (CoN) (n=6)	إجمالي العزلات (n=53)
أموكسيسيلين– الكلافيولونيك	5 (%23.5)	2 (%15.4)	0 (%0)	1 (%12.5)	0 (%0)	8 (% 15.1)
بيبراسيلين– تازوباكتام	16 (%76.1)	9 (%69.2)	2 (%40)	5 (%62.5)	2 (%33.3)	34 (% 64.2)
السيفوتاكسيم	7 (%33.3)	3 (%23.1)	0 (%0)	2 (%0.25)	0 (%0)	12 (% 22.6)
سيفبودواكسيم	11 (%52.3)	7 (%53.8)	3 (%60)	5 (%0.62.5)	4 (%66.6)	30 (%56.6)
سفترياكسون	17 (%80.9)	8 (%61.5)	2 (%40)	6 (%75)	3 (%50)	36 (%67.9)
سيفوروكسيم	8 (%38.1)	3 (%23.1)	1 (%20)	4 (%50)	0 (%0)	16 (%30.2)

سيفيم	11 (%52.4)	(%30.8) 4	(%20) 1	(%37.5) 3	(%50) 3	(%41.5) 22
سيبروفلوكساسين	(%71.4)15	(%30.8) 4	(%60) 3	(%62.5) 5	(%33.3) 2	(%54.7) 29
نوروفلواكساسين	(%80.1)17	(%61.5) 8	(%80) 4	(%75) 6	(%83.3) 4	(%73.6) 39
نتروفورانتوين	(%71.2)15	(%53.8) 7	(%60) 3	(%75) 6	(%50) 3	(% 64.2) 34
أميكاسين	76.2)16 ("%)	(%61.5) 8	(%80) 4	(%75) 6	(%100) 5	(% 73.6) 39
إيميبينيم	20 (%95.2)	(%92.3) 12	(%100) 5	(%100) 8	(%100) 6	(% 94.3) 50
ترايميثوبريم– سلفاميتواكسازول	(%19.1) 4	(%23.1) 3	(%20) 1	(%75) 6	(%0) 0	(% 26.4) 14



الشكل (3): الأنواع الجرثومية المسببة للانتانات البولية والمكونة للغشاء

الجدول (2): توزع العزلات المكونة للغشاء الحيوي بين الرجال والنساء

النوع الجرثومي	عدد ونسبة العزلات المكونة للغشاء الحيوي في النوع الجرثومي	رجال	نساء
		عدد و نسبة العزلات المكونة للغشاء الحيوي	عدد ونسبة العزلات المكونة للغشاء الحيوي
E.coli	(% 66.7) 14	(%35.7) 5	(%64.3) 9
K.pneumoniae	(%92.3) 12	(% 41.7) 5	(% 58.3) 7
Psuedomonas spp	(%60) 3	(%66.7) 2	(%33.3)1
Citrobacter spp	(%50) 4	(%25) 1	(%75) 3
Coagulase- negative (CoN) *Staphylococcus*	(% 83.3) 5	(% 40) 2	(%60) 3

تمتلك أنواع الجراثيم المسببة لإنتانات الجهاز البولي العديد من عوامل الفوعة اللازمة للالتصاق الأولي واستعمار مخاطية السطوح ومن ثم غزو الخلايا والأنسجة والتغلب على الدفاعات المناعية وتتضمن هذه العوامل الأشعار المختلفة pilus وبروتين Adhesion بالاضافة إلى إفراز الذيفانات والأنزيمات الخارجية [16].

تمتلك الكليبسلا الرئوية العديد من عوامل الفوعة كالمحفظة الكثيفة مكونة من عديدات السكاكر المخاطية وطبقة عديدات السكاكر الشحمي Lipopolysaccharides (LPS) والأشعار fimbriae من نمط 1 و3. تساهم عوامل الفوعة هذه في إحداث المرض كما تساهم في تشكيل الغشاء الحيوي . تلعب طبقة LPS دوراً في الالتصاق المبدئي أما المحفظة فتساهم في تكوين البنية الأساسية لغشاء الحيوي الناضج وتساهم الأشعار في تثبيت الكليبسلا على الخلايا الظهارية في المثانة [24، 25].

تمت مقارنة نسب العزلات المكونة للأغشية الحيوية من حيث مقاومتها للمضادات الحيوية وقد أظهرت النتائج أن 80% من العزلات المكونة للغشاء الحيوي كانت متعددة المقاومة للمضادات الحيوية.

لقد ذكر Khelkal (2015) نسبة مقاربة للنسبة التي ذكرتها الدراسة الحالية حيث وجد أن من بين 60 عزلة *E.coli* متعددة المقاومة للمضادات الحيوية كانت (88.3 %) مكونة للأغشية الحيوية [26]. كانت النسبة المسجلة في دراسة فاتيميا وآخرون (2014) 41% منها 54% متعددة المقاومة للمضادات الحيوية [21]. وبلغت النسبة في دراسة عبدالله وآخرون (2014) 30% من إجمالي عزلات MDR كانت مكونة للأغشية الحيوية مع تسجيل عزلات الكليبسيللا الرئوية للنسبة الأكبر (100%) [20]. وهوما يتوافق مع الدراسة الحالية حيث كانت جميع عزلات الكليبسيلا الرئوية المتعددة المقاومة MDR هي عزلات مكونة للغشاء الحيوي.

لقد بينت دراسة Naparstek وآخرون (2014) وجود اختلاف واضح بين عزلات الكليبسيلا الرئوية المكونة للغشاء الحيوي وتلك الغير مكونة للغشاء الحيوي، من حيث المقاومة للجنتامايسين ولوحظ ازدياد المقاومة في العزلات المكونة للغشاء الحيوي 234 ضعفاً مقارنة بتلك العزلات غير المكونة للغشاء الحيوي [27].

إن انتشار المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ضمن العزلات المسببة لانتانات الجهاز البولي والمكونة للأغشية الحيوية وتشكل مصدراً لنقل مورثات المقاومة لجراثيم المشافي الأخرى و تترافق مع العديد من الإنتانات المزمنة و المنتكسة التي تستعصي على العلاج التقليدي بسبب ضعف نفوذية المضادات خلال الملاط السكري [12].

لقد طرحت بعض الأبحاث الحدثية اقتراحات للتغلب على الإنتانات المسببة بالجراثيم المكونة للأغشية الحيوية، منها استخدام الدمج بين المضادات الحيوية مع الماكروليدات. فلقد تم اثبات فعالية الاريثرومايسين والكلاريثرومايسين والأزيترومايسين بالزجاج وبالجسم الحي في القضاء على الجراثيم سلبية –غرام المكونة للأغشية الحيوية وذلك بسبب تثبيطها للألجينيت alginate وهومكون أساسي بالملاط السكري عند الجراثيم سلبية غرام [15].

الجدول (3): توزع عزلات MDR من حيث قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي

النوع الجرثومي	عدد عزلات MDR (النسبة تبعاً للنوع)	عزلات MDR (n= 25)	
		مكونة للبيوفيلم (% من إجمالي MDR تبعاً للنوع)	غير مكونة للبيوفيلم (% من إجمالي MDR تبعاً للنوع)
E.coli	(%52.4) 11	(%63.6) 7	(%36.3) 4
K. pneumoniae	(% 46.2) 6	(% 100) 6	(% 0) 0
Psuedomonas spp	(% 40) 2	(% 50) 1	(%50) 1
Citrobacter spp	(%37.5) 3	(%66.6) 2	(%33.4) 1
Coagulase- negative (CoN) *Staphylococcus*	(% 60) 3	(%66.6) 2	(% 33.4) 1

الاستنتاجات والتوصيات

تدل نتائج الدراسة على وجود نسبة مرتفعة من المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية بين الجراثيم المسببة لانتانات الجهاز البولي، بالإضافة إلى وجود نسبة عالية بين هذه الجراثيم قادرة على تكوين الأغشية الحيوية مما يعوق استجابة هذه الإنتانات للعلاج التقليدي بالمضادات الحيوية ويؤدي إلى تحولها لأمراض مزمنة.

إن اختبار الالتصاق على الأنبوب لتقييم قدرة الجراثيم على تشكيل الغشاء الحيوي هو اختبار بسيط وغير مكلف وذو نتائج موثوقة، لذلك توصي هذة الدراسة بإجراء اختبار تقييم قدرة الجراثيم المعزولة من انتانات الجهاز البولي بشكل روتيني في المختبرات الجرثومية ليتم اتخاذ الاجراءات المقترحة لعلاج الأمراض المسببة بالجراثيم المكونة للأغشية الحيوية .

المراجع

1. Rabin, N.; Zheng, Y.; Opoku-Temeng, C.; Du, Y.; BonsuHerman, E.; Sintim, O. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents, Future Medicinal Chemistry. 2015, 493–512.
2. Costerton, J.W.; Cheng K.J.; Geesey, G.G.; Ladd, T.I.; Nickel, J.C.; Dasgupta, M.; Marrie, TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. Annual Review of Microbiology 1987, 41, 435–46.
3. Hoiby, N.; Flensborg, E.; Beck, B.; Friis, B.; Jacobsen, S.; Jacobsen, L. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. Scandinavian journal of respiratory diseases 1977, 58(2), 65–79.
4. Flemming, H.C.; Wingender, J. The biofilm matrix. Natural Review in Microbiolology, 2010, 8, 623-633.
5. Prakash, B.; Veeregowda, B. M; Krishnappa, G. Biofilms: A survival strategy of bacteria. Current Science, 2003, 85(9), 1299-1307.

6. Abee, T.; Kova, A.; Kuipers, O. P.; Veen, S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. Current Opinion in Biotechnology, 2011, 22, 172–179.

7. Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D. G.; Costerton, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. Annual Review of Microbiology. 2002, 56, 187–209.

8. Sanchez, C.J.; Mende, K.; Beckius, M.L.; Akers, K.S.; Romano, D.R.; Wenke, J.C.; Murray, C.K. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. BMC Infectious Diseases**,** 2013, 13, 47-55.

9. Penesyan, A.; Gillings, M.; Paulsen, I.T. Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. Molecule, 2015, 20, 5286-5298.

10. Leid, J.G; Willson C.J; Shirtliff M.E.; Hassett D.J.; Parsek, M.R.; Jeffers, A.K. The exopolysaccharide alginate protects Pseudomonas aeruginosa biofilm bacteria from IFNgamma- mediated macrophage killing. Journal of Immunology, 2005, 175(11), 7512–7518.

11. Ashby, M.J.; Neale, J.E.; Knott, S.J.; Critchley, I.A. Effect of antibiotics on non-growing planktonic cells and biofilms of *Escherichia coli*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1994**,** 33(3), 443–452.

12. Mah, T.F.; O'Toole, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiology. 2001, 9, 34-39.

13. Savage, V.J.; Chopra, I.; O'Neill; A.J. *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy**,** 2013, 57(4), 1968–1970.

14. O'Toole, G.; Kaplan, H.B.; Kolter, R. Biofilm formation as microbial development. Annual Review of Microbiology**,** 2000, 54, 49–79.

15. Soto, S.M. Importance of biofilms in urinary tract infections: new therapeutic approaches. Advances in Biology, 2014, 1-13.

16. Delcaru, C.; Alexandru, I.; Podgoreanu, P.; Grosu, M.; Stavropoulos, E.; Chifiriuc, M.C.;and Veronica Lazar. Microbial Biofilms in Urinary Tract Infectionsand Prostatitis: Etiology, Pathogenicity, and Combating strategies. Pathogens, 2016, 5, 65, 1-12.

17. Clinical and laboratory standards Institute.M100-S23, 2013, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.

18. Center of Disease control, Multidrug Resistant Organism &*Clostridium difficile* infection (MDRO/CDI) Module. Jan, 2014, 1-6.

19. Alves, M.J.; Barreira, J. C. M.; Carvalho, S.; Trinta, L.; Perreira, L.; Ferreira, R.; Pintado, M. Propensity for biofilm formation by clinical isolates from urinary tract infections: developing a multifactorial predictive model to improve antibiotic therapy. Journal of Medical Microbiology, 2014, 63, 471–477.

20. Abdallah, N.; Elsayed, S.B.; Yassin, M.; Mostafa, M.; G. El-gohary, M. Biofilm forming bacteria isolated from urinary tract infection, relation to catheterization and susceptibility to antibiotics. International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research 2011, 2, 172-178.

21. Fatima, S.; Prasanthi, K.; Nagamani, K. Comparative evaluation of biofilm production in Multidrug resistant and sensitive Gram negative clinical isolates International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**,** 2015, 4(6), 918-926.

22. Khawcharoenporn, T.; Vasoo, S.; Singh, K. Urinary Tract Infections due to Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae: Prevalence and Risk Factors in a Chicago Emergency Department. Emergency Medicine International, 2013, 345-352.

23. Eshetie, S.; Unakal, C.; Gelaw, A.; Ayelign, B.; Endris, M.; Moges, F. Multidrug resistant and carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* among patients with urinary tract infection at referral Hospital, Northwest Ethiopia Antimicrobial Resistance and Infection Control, 2015, 4, 12, 1-8.

24. Balestrino, D.; Ghigo, J.M.; Charbonnel, N.; Haagensen, J.A.; Forestier, C. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 10, 685–701.

25. Vuotto, C.; Longo F.; Balice, M.; Gianfranco Donelli Varaldo, P.E. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *klebsiella pneumoniae.* Pathogens, 2014, 3, 743-758.

26. Khelkal, I.N. Biofilm formation and antibiotic resistance of uropathogenic *E. coli* isolated from urinary tract of catheterized patients. Journal of Gene and Environmental Resources, 2015, 3(1), 66-73.

27. Naparstek, L.; Carmeli, Y.; Navon-Venezia, S.; Banin, E. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy**.** 2014, 69, 1027–1034.