تقييم كفاءة طريقة الأنابيب في التحري المظهري عن تكوين الغشاء الحيوي في جرثومتي ***Staphylococcus aureus*** و ***Pseudomonas aeruginosa*** المعزولتين من عينات مرضية مُختلفة

م.م.عمر غياث محمد حياوي ا .د .محسن أيوب عيسى العكيدي

جامعة الموصل/ كلية التربية الأساسية *جامعة الموصل / كلية العلوم*

(قدم للنشر في 2018/6/12 ، قبل للنشر في 2018/7/15)

الخُلاصة:

أُجريت الدراسة الحالية بهدف التحري مظهريا عن قابلية تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm) في جرثومتي *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* المعزولتين من عينات مرضية مُختلفة بطريقة الأنبوب. أظهرت النتائج أمتلاك (37%) و(19%) من عزلات النوع *S.aureus* قابلية مُتوسطة وضعيفة (على التوالي) على تكوين الغشاء الحيوي فيما بدت (44%) من العزلات التابعة لهذا النوع غير قادرة على تكوين الغشاء الحيوي باستخدام هذه الطريقة. بالمُقابل تراوحت قابلية عزلات النوع *P.aeruginosa* على تكوين الغشاء الحيوي بهذه الطريقة بين القوية التي مثلت النسبة الأعلى (50%) والمُتوسطة والضعيفة وبنسب (30%) و (10%) على التوالي فيما لم تُظهر (10%) من عزلات هذا النوع أي قدرة على تكوين الغشاء الحيوي باستخدام هذه الطريقة.

Evaluating the efficiency of Tube Method in phenotypic Investigation of Biofilm formation by *Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa* isolated from different clinical sources

Abstract:

The objective of this study was phenotypic detection of biofilm formation by *S.aureus* and *P.aeruginosa* isolated from different clinical specimens using tube method. The results showed that (37%) and (19%) of *S.aureus* isolates have moderate and weak ability to form a biofilm , respectively, whereas (44%) of *S.aureus* isolates were unable to form biofilm using this method. On the other hand the ability of *P.aeruginosa* isolates to form biofilm using tube method was varied between strong, which represent the higher percentage (50%), to moderate and weak which represent (30%) and (10%) respectively whereas only (10%) of *P.aeruginosa* isolates where unable to form a biofilm using this method.

المُقدمة

الغشاء الحيوي هو مصفوفة من الخلايا الفعالة الساكنة تعود لنوع جرثومي واحد أو عدة أنواع من الجراثيم تميل للإلتصاق والنمو على الأسطح الصلبة – الرطبة تنتظم في مستعمرات دقيقة تؤلف 10–25% منه وهي مغلفة و منطمرة بمادة أساس خارجية تؤلف حوالي 75–90% منه ذات طبيعة لزجة مكونة أساسا من متعدد السكريات تفرزها الخلايا المُكونة للغشاء (Garrett *et al*,2008; Simo˜es *et al*,2010; Banerjee *et al*,2015). عادة ما تكون الأغشية الحيوية ممرضة في طبيعتها وهي تُكتسب غالبا من المُستشفيات وقد توصلت مُنظمة الصحة العالمية إلى أن هذه التراكيب تتسبب فيما لايقل عن 65% من مُجمل الإصابات الجرثومية واليها يُعزى ما لا يقل عن 80% من الإصابات المُزمنة (Jamal *et al*,2018). لذا فقد غدا الغشاء الحيوي من المواضيع الرئيسة البارزة في الحقل الطبي بسبب مأيبديه هذا التركيب من مُقاومة تجاه مناعة الجسم والمضادات الحيوية على حد سواء (Pozo, 2018).

يتسبب النوعان الجرثوميان *S.aureus* و *P.aeruginosa* في إحداث إصابات إنتهازية للجسم وكثيرا ما يرتبطان بعدوى المُستشفيات (Brooks *et al*, 2013; Jenny *et al*,2014) بالأخص تلك الناتجة عن استخدام اللوازم الطبية العلاجية كأستخدام المُبخرة في علاج أمراض الجهاز التنفسي أو القثاطر البولية أو إصابات الجروح والتي تبرز فيها قوة الإصابة نتيجة لقابلية الجراثيم على تكوين الأغشية الحيوية (Percival *et al*,2015) ، كما شُخصت هاتان الجرثومتان على أنهما الأكثر قابلية على إنتاج الغشاء الحيوي من بين الجراثيم المعزولة من الإصابات المزمنة للتقرحات الجلدية (Di Domenico *et al*,2017) فضلا عن ذلك فقد شُخص الدور الرئسي للغشاء الحيوي الذي تكونه جرثومة *P.aeruginosa* في الإصابات المُزمنة للرئة وبالأخص مرض التليف الكيسي Cystic Fibrosis الذي يتسبب في تزايد أعداد الوفيات بشكل ملحوظ. (Maurice *et al*,2018; Asbury and A Jazayeri, 2018).

طريقة الأنبوب Tube Method (TM) هي إحدى الطرق النوعية في التحري عن الأغشية الحيوية أستخدمت لأول مرة من قبل الباحث (Christensen *et al*,1982) في التحري عن قابلية العزلات التابعة للنوع *S.epidemidis* على تكوين الغشاء الحيوي وهي تعتمد على قابلية الجراثيم على التحول من

الشكل الطافي في الوسط الزرعي الى الشكل الساكن المُلتصق والذي يُبطن جدران الأنبوبة وقعرها أثناء فترة التحضين والذي يُستدل عليه باستخدام بعض الصبغات (صبغة البلورات البنفسجية عادة) ثم تُقيم النتائج الى ضعيفة ومتوسطة وقوية أعتمادا على درجة الأصطباغ (Hassan *et al*,2011).

ونظرا للأهمية الصحية والبيئية للغشاء الحيوي فقد تم إجراء هذا البحث بهدف تقييم كفاءة طريقة الأنابيب في التحري المظهري عن تكوين الغشاء الحيوي في جرثومتي *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* المعزولتين من عينـات مرضية مُختلفة.

المواد وطرائق العمل

المواد:

-الجراثيم المُستخدمة في الدراسة: شملت الدراسة (26) عزلة مرضية تضمنت : (16) عزلة تابعة للنوع *S.aureus* و (10) عزلات تابعة للنوع *P.aeruginosa* تم عزلها من عينات مرضية مُختلفة شملت (عينات جلدية ، عينات من الجهاز التنفسي ، دم ، إدرار ، مسحات مهبلية) وشُخصت في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم باستخدام الطرق التقليدية بالأعتماد على ما جاء في (Brook *et al*,2013 ,Forbes *et al*,2007, Winn *et al*,2006) .

-الوسط الزرعي Tryptone Soya Broth (TSB) المُجهز من شركة India– Himedia

-المحلول الملحي الفسلجي 0.85%

-صبغة الكرستال البنفسجية 0.1% المُجهزة من شركة England–Atomic Scientific

طريقة العمل:

استخدمت طريقة الأنبوب Tube Method (TM) في التحري عن قابلية العزلات المدروسة على تكوين الأغشية الحيوية ، وتعتمد هذه الطريقة على الملاحظة المباشرة للأغشية الحيوية بعد تنميتها على وسط TSB في انابيب اختبار زجاجية لمدة 24 ساعة.أُجريت الطريقة استنادا إلى (Christensen *et al* 1982, Hassan *et al*,2011) وكما يلي:

1. نقلت مستعمرة واحدة من مزرعة حديثة الى انابيب حاوية 1.5 سم^3 وسط TSB.
2. حضنت لمدة 24 ساعة بدرجة 37 مْ.

3. سكب الوسط ثم غُسلت الأنابيب بالمحلول الملحي لإزالة الخلايا غير الملتصقة.
4. أضيفت صبغة الكرستال البنفسجية 0.1% لمدة 15–20 دقيقة.
5. أزيلت الصبغة ثم غُسلت الأنابيب لإزالة الصبغة الزائدة.
6. لوحظ أصطباغ الأنبوب في المنطقة المزروعة وبالأخص ظهور الحلقة البنفسجية في الطبقة السطحية.
7. سُجلت النتائج وقُيمت بالأعتماد على درجة اصطباغ الجدران الداخلية للأنبوب .

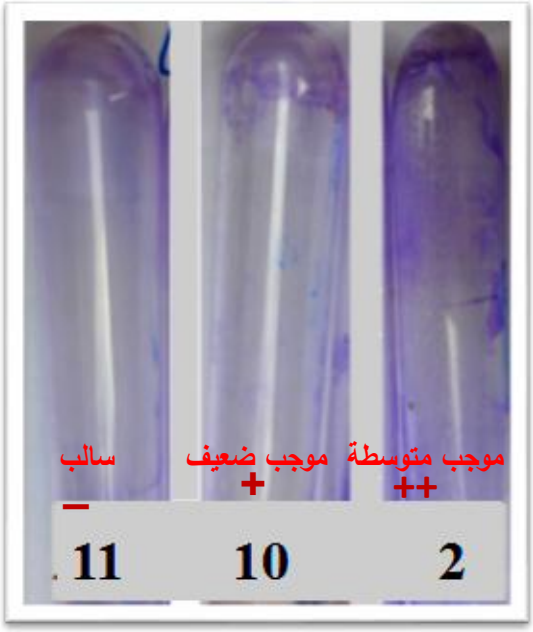
النتائج والمُناقشة

الجدول رقم (1) يوضح النتائج التي تم الحصول عليها عند أختبار قابلية عزلات *S.aureus* على تكوين الغشاء الحيوي على الأنابيب الزُجاجية إذ يتبين من الجدول أن نسبة العزلات التي أظهرت القابلية على الألتصاق وتكوين الغشاء الحيوي كانت 56% وقد تفاوتت العزلات في هذه القابلية بين الضعيفة والتي شكلت نسبة(19%) والمتوسطة والتي شكلت نسبة (37%). في حين لم تظهر 44% من العزلات هذه القابلية. لوحظ ان عزلات *S.aureus* تميل(بنسبة كبيرة) الى النمو داخل الوسط السائل مسببة في تعكره وهي الحالة الأغلب لهذه الجرثومة مع وجود اعداد من الخلايا تميل للنمو بالشكل الساكن إذ تتعلق على جوانب الأنبوبة وأحيانا تظهر في الطبقة السطحية للوسط السائل على جدران الأنبوبة وهي التي يمكن ملاحظتها بشكل حلقة سطحية خفيفة بعد صبغها بالصبغة البنفسجية (الصورة 1). على الرغم من أمتلاك النوع *S.aureus* لواصق تعرف بمصطلح Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs) تبرز من سطح الخلية إلا أنها متخصصة فقط لتكون أرتباط متخصص مع مستقبلات متواجدة على السطوح الحية كخلايا ومكونات الجسم المختلفة وليس لها دور في الإلتصاق على السطوح غير الحية الذي يوصف بأنه غير متخصص تلعب فيه العوامل الفيزيائية كصفة الكراهة للماء، القوى الأليكتروستاتيكية(الشحنات الكهربائية) لسطح الخلية والسطح الساند، ودرجة حرارة الوسط ، حامضية الوسط ، خشونة السطح ، طاقة السطح، وغيرها من العوامل الدور الأبرز (Reffuveille *et al* 2017;Moormeier and Bayles, 2017).

جدول (1): نتائج التحري عن تكوين الأغشية الحيوية في عزلات النوع *S.aureus* بطريقة TM

تسلسل العزلة	مصدر العزلة	نتيجة الأختبار	تقييم النتيجة
1.	إصابات جلدية (جروح -حروق - وأخرى)	++	موجبة متوسطة
2.		++	موجبة متوسطة
3.		++	موجبة متوسطة
4.		–	سالبة
5.		–	سالبة
6.		++	موجبة متوسطة
7.		++	موجبة متوسطة
8.		+	موجبة ضعيفة
9.		++	موجبة متوسطة
10.		–	سالبة
11.	إدرار	–	سالبة
12.	دم	+	موجبة ضعيفة
13.	مسحات مهبلية	–	سالبة
14.	قشع	–	سالبة
15.		–	سالبة
16.	التهاب جيوب	+	موجبة ضعيفة

الموجبة الكلية		الموجبة القوية		الموجبة المتوسطة		الموجبة الضعيفة		السالبة	
عدد	%	عدد	%	عدد	%	عدد	%	عدد	%
9	56	0	0	6	37	3	19	7	44



الصورة(1) النتائج الموجبة والسالبة لأختبار TM في عزلات النوع *S.aureus* (2، 10، 11) حيث جدران الأنبوبة مصطبغة بصبغة الكرستال البنفسجية 0.1%

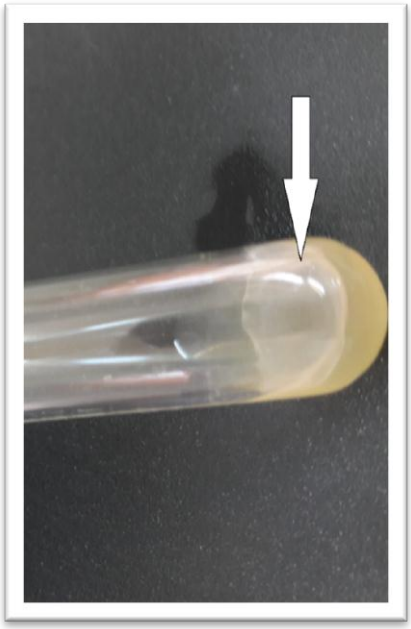
بالمُقابل فقد أظهرت نتائج التحري عن تكوين الأغشية الحيوية لجرثومة *P.aeruginosa* بطريقة الأنابيب الزجاجية من خلال قابليتها للإلتصاق والنمو على جدار الأنبوبة وإنتاج الشكل النهائي للغشاء حيوي وكما مُبين في الجدول (2) أن نسبة العزلات الموجبة لتكوين الغشاء الحيوي بلغت 90% وقد تفاوتت في قدرتها على تكوينه بين القوية والتي شكلت النسبة الأعلى (50%) والمتوسطة والتي شكلت نسبة (30%) والضعيفة والتي شكلت نسبة (10%) . في حين لم تمتلك 10 % من العزلات هذه القابلية. كما ذُكر سابقا فإن طريقة TM هي طريقة نوعية تحدد نوع الغشاء الحيوي الذي تكونه الجرثومة والذي يعتمد أولا على شكل النمو الذي تتخذه ، فقد وجد في هذا الأختبار أن معظم عزلات *P.aeruginosa* التي درست تنمو على السطح وهي تميل للإلتصاق بشكل واضح على جدار الأنبوب الزجاجي في الطبقة السطحية من الوسط وظهرت العديد منها بشكل طبقة مخاطية تعرف بالـ pellicle طافية على سطح الوسط السائل ، لذا فقد ظهر الغشاء الحيوي الذي كونته جرثومة *P.aeruginosa*

ملتصقا على الجدران الداخلية في الطبقة السطحية. كما تُنجَز عملية الإلتصاق في هذه الجراثيم بوجود عاملين مهمين وهما شعيرات النوع الرابع وقدرتها على إنتاج مادة متعدد السكريات الدهني نوع B الذي يكون محب للماء وهو عامل مُهم في الإلتصاق على الأسطح الزجاجية (المُحبة للماء) وعادة ماتنتجه الجرثومة أستجابة لنوع البيئة التي تقطُنها (Laverty *et al*,2013) . يترك النمو بهذا الشكل المُلتصق أثرا واضحا على جدران السطح الزجاجي للأنبوب وهي تقاوم عملية الغسل لذا تظهر، بعد صبغها بالصبغة البنفسجية بشكل حلقة سطحية سميكة كما موضح في الصورة (**2**) .

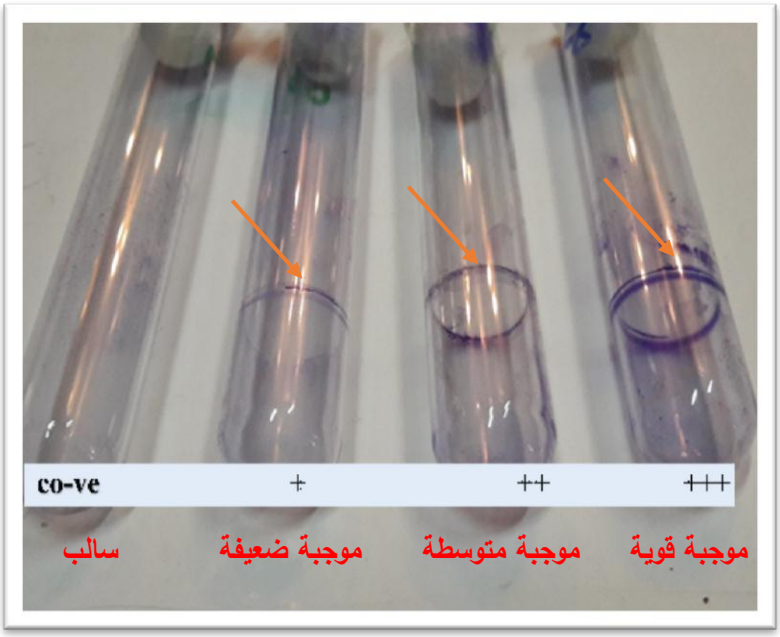
الجدول 2: نتائج التحري عن تكوين الغشاء الحيوي في عزلات النوع *P.aeruginosa* بطريقة TM

رقم العزلة	مصدر العزلة	نتيجة الأختبار	تقييم النتيجة
.1	إصابات جلدية (جروح-حروق وأخرى)	+++	موجبة قوية
.2		+++	موجبة قوية
.3		+++	موجبة قوية
.4		++	متوسط القوة
.5		++	متوسط القوة
.6		+++	موجبة قوية
.7	دم	++	موجبة متوسطة
.8		-	غير مكون
.9	مسحة مهبلية	+++	موجبة قوية
.10	التهاب جيوب	+	موجبة ضعيفة

الموجبة الكلية		الموجبة القوية		الموجبة المتوسطة		الموجبة الضعيفة		السالبة	
عدد	%	عدد	%	عدد	%	عدد	%	عدد	%
9	90	5	50	3	30	1	10	1	10



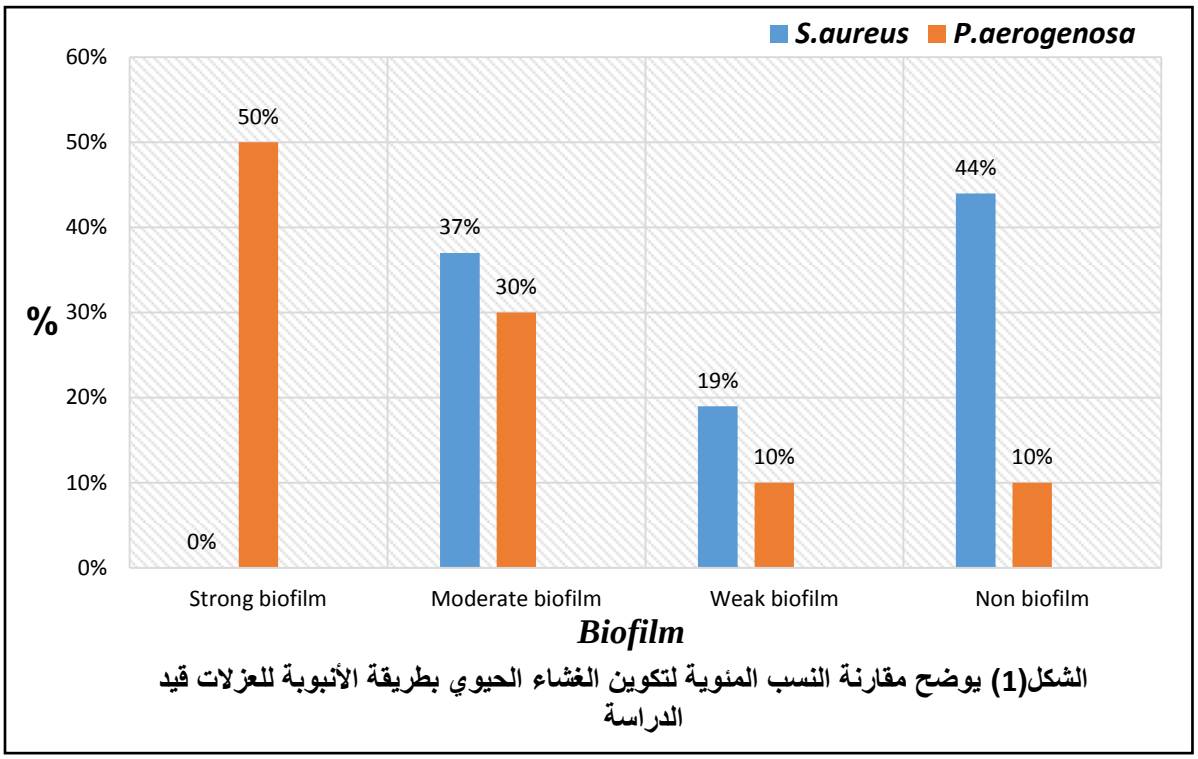
-أ-



-ب-

الصورة(2) النتائج الموجبة لتكوين الغشاء الحيوي في بعض عزلات النوع *P.aeruginosa* بطريقة TM حيث:أ: Pellicles بعمر 24 ساعة ب: تباين تكوين الغشاء الحيوي في عزلات النوع *P.aeruginosa* بعد 24 ساعة

من خلال مُلاحظة الشكل (1) يظهر الفارق الكبير في النسب المئوية لقوة الغشاء الحيوي في كلا النوعين باستخدام طريقة TM إذ نجد أن العزلات التابعة للنوع *P.aeruginosa* كونت أغشية حيوية واضحة متماسكة ظهرت بشكل حلقة متثخنة على جدار الأنبوبة الزجاجية لأسباب منها: قابلية جراثم النوع *P.aeruginosa* على الحركة (O'Toole, 2011) أضف الى ذلك فإن قابلية جرثومة *P.aeruginosa* على إنتاج الطبقة المخاطية السطحية دعم وبقوة قابلية الجرثومة على الإلتصاق وإظهار النتيجة الموجبة الصورة(2) (Abidi *et al*, 2013).



الشكل(1) يوضح مقارنة النسب المئوية لتكوين الغشاء الحيوي بطريقة الأنبوبة للعزلات قيد الدراسة

References

Abidi S.H., Sherwani S.K., Siddiqui T.R., Bashir A. and Kazmi S.U. (2013). Drug resistance profile and biofilm forming potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from contact lenses in Karachi-Pakistan. *J. BMC Ophthalmology* 13(57).Available at: http://www.biomedcentral.com/1471-2415/13/57

Asbury J. and A Jazayeri J. (2018). The Significance of Pseudomonas aeruginosa Infection and Biofilms to the Cystic Fibrosis Patients: The Need for the Development of New Therapies. *J.Adv.Biotechnol. and*

Ulcers Independently from the Multidrug Resistant Phenotype. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1077; doi: 10.3390 /ijms 18051077.

Forbes, B.A.; Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S and Trevino E.A. (2007). Baily and Scott's Diagnostic Microbiology.12th ed. Mosby. Inc.USA.

Garrett T, Bhakoo M, and Zhang Z.(2008). Review "Bacterial adhesion and biofilms on surfaces". *J. Progress in Nat. Sci*.18(2008) :1049–1056.

Hassan A., Usman J., Kaleem F.,Omair M., Khalid A. and Iqbal M.(2010). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis*. 15(4):305-311

Jamal M., Ahmad W., Andleeb S., Jalil F., Imran M., Nawaz M., Hussain T., Ali M., Rafiq M., and Kamil M. (2018). Bacterial biofilm and *Microbiol*.8(4).2018 DOI: 10.19080/AIBM.2018.08.555742.

Banerjee P., Singh M. and Sharma, V .(2015). Biofilm Formation: A Comprehensive Review. *Int. J. Pharma Res. and Health Sciences*. 3 (2):556-560.

Brooks G., Caroll K., Butel J. Morse S. Mietzner T. (2013). Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology 26th ed. McGraw-Hill Companies, Inc.USA.

Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachey E.H . (1982). Adherence of Slime-Producing Strains of *Staphylococcus epidermidis* to Smooth Surfaces . *J . Infect. & Immun*. 37(1):318-326.

Di Domenico E., Farulla I., Prignano G.,Gallo M., Vespaziani M., Cavallo I., Sperduti I., Pontone M., Bordignon V., Cilli L., Santis A., Di Salvo F., Pimpinelli F., Parola I.,Toma L. and Ensoli F.(2017). Biofilm is a Major Virulence Determinant in Bacterial Colonization of Chronic Skin

Moormeier D. E. and Bayles K.W. (2017) . Staphylococcus aureus biofilm: a complex developmental Organism (Microreview).J. Molecular Microbiol. , 104(3): 365–376.

O'Toole G.A.. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay (Video Article). J. Visualized Experiments. http://www.jove.com/details. php?id=2437, doi: 10.3791/2437

Percival S., Suleman L., Vuotto C. and Donelli G. (2015). Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *J. of Med. Microbiol*. (2015) (64):323–334.

Pozo J. (2018). Biofilm-related disease. *J. Expert. Rev. of Anti-Infective Therapy*.16(1):51-65. (Abstract).

Reffuveille F, Josse J., Vallé Q., Mongaret C. and Gangloff S.C.(2017) . *Staphylococcus* associated infections. *J. Chinese Med. Association*. 81 (2018) 7-11.

Jenney A., Holt D., Ritika R., Southwell P., Pravin S., Buadromo E., Carapetis J., Tong S. and Steer A.(2014). The clinical and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections in Fiji *J. BMC Infect. Dis*. 2014(14):160-166.

Laverty G., Gorman L.G., and Gilmore, B. F. (2013). Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. J.Fut. Microbial. , 8(4), 509-24.

Maurice N. Bedi B. and Sadikot R.(2018). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: Host response and clinical implications in lung infections. *Amer. J. of Respiratory cell and Mol. Biol.* 58(4). https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0321TR. (Abstract).

aureus Biofilms and their Impact on the Medical Field, The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* , Dr. Shymaa Enany (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/66380.

Simo˜es M. , Simo˜es L., Vieira M. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *J. LWT - Food Science and Technol*. 43 (2010) :573–583.

Winn W., Allen S., Janda W., Koneman E., Proscop G. Schrenckenberger P. and Woods G. (2006). Konemaṅ s Color Atlas and Textbook Of Diagnostic Microbiology 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins Washington Dc. USA.