

بررسی تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های بوردتلا پرتوسیسی با روش in vitro biofilm formation

نویسندگان: طیبه شهبازی^۱، پرویز اولیا^۲، فرزاد بادمستی^۳، علی بادامچی^۳، پوران بدیری^۴، فرشته شاهچراغی^{۳*}

۱. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۳. گروه باکتری‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۴. گروه ژنتیک، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: فرشته شاهچراغی E-mail: shahcheraghifereshteh@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: بوردتلا پرتوسیسی یک باکتری کوکوباسیل گرم منفی و عامل سببی بیماری حاد تنفسی سیاه‌سرفه است که شمار مبتلایان به آن در سال‌های اخیر رو به فزونی است. توانایی تولید بیوفیلم، به این باکتری در تداخل با سیستم ایمنی میزبان، شدت بیماری و حساسیت آنتی‌بیوتیکی کمک می‌کند. لذا با توجه به اهمیت این فاکتور، در این تحقیق ما توانایی جدایه‌های بوردتلا پرتوسیسی را در تشکیل بیوفیلم مورد آزمایش قرار دادیم.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های نازوفارنکس افراد مشکوک به سیاه‌سرفه طی سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۵ از سراسر ایران جمع‌آوری و به آزمایشگاه مرجع سیاه‌سرفه در انستیتو پاستور ایران منتقل شدند. باکتری موردنظر از طریق کشت جداسازی شد به‌طوری‌که ما نهایتاً ۲۰ نمونه مثبت داشتیم. در نهایت، آزمایش in vitro biofilm formation را برای سویه‌های جداشده انجام دادیم.

نتایج: ۲۰ نمونه بالینی بوردتلا پرتوسیسی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند همگی قادر به تشکیل بیوفیلم بودند و نیز با توجه به اینکه OD خوانده‌شده نهایی برای آن‌ها بین ۰/۶۰۶ و ۱/۲۱۲ شد، لذا قدرت بیوفیلم تشکیل‌شده به وسیله آن‌ها متوسط است.

نتیجه‌گیری: یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر مشابه تحقیقات انجام‌شده توسط دیگر محققان است که می‌تواند نشان‌دهنده توانایی سویه‌های بوردتلا پرتوسیسی در تشکیل بیوفیلم و ایجاد اثرات سوء ناشی از آن بر میزبان باشد، مانند مقاومت آنتی‌بیوتیکی، شدت بیماری و غیره. لذا با توجه به اهمیت این موضوع، نیاز به تحقیقات بیشتر و گسترده‌تری در این زمینه است.

واژگان کلیدی: بوردتلا پرتوسیسی، بیوفیلم، in vitro biofilm formation

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌ونجم-شماره ۱۳۱
آبان ۱۳۹۶

دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۱۵
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۶/۰۷/۳۰
پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۰۷

مقدمه

بوردتلا پرتوسیس یک باکتری کوکوباسیل گرم منفی و عامل بیماری سیاه‌سرفه است (۱،۲). سیاه‌سرفه یا پرتوسیس یک بیماری تنفسی با شدت و حدت بالاست (۳). این بیماری به‌طور معمول دارای ۴ مرحله اصلی است. یک دوره انکوباسیون بین ۱ تا ۳ هفته که پس‌از آن مرحله دوم یعنی کاتارال آغاز می‌شود. این مرحله می‌تواند تا چندین هفته ادامه یابد. مرحله سوم پاروکسیسمال است که مشخصه آن سرفه‌های انقباضی و سرفه‌های معمولی است. این فاز ممکن است با سیانوز و استفراغ همراه باشد و تا ۱۰ هفته طول بکشد. نهایتاً مرحله آخر فاز نقاهت است که به مدت چند هفته ادامه دارد و طی آن شاهد کاهش تدریجی شدت و فراوانی علائم مراحل قبل خواهیم بود (۴). براساس گزارش‌ها به نظر می‌آید سالانه حدوداً ۱۶ میلیون مورد ابتلا به سیاه‌سرفه و تقریباً ۱۹۵ هزار مرگ در اثر این بیماری اتفاق می‌افتد (۳،۵). در مورد ایران نیز طبق گزارش‌های ارائه‌شده از مرکز مدیریت بیماری‌ها در ایران (آمار منتشر نشده)، آمار میزان بیماری باوجود پوشش واکسیناسیون حدود ۹۹ درصد در سال‌های اخیر، افزایش یافته که می‌تواند ناشی از کاهش ایمنی بدن بعد از واکسیناسیون، انجام ناقص واکسیناسیون، وجود سوش‌های پلی-مورفیک بر اثر جهش‌های ژنی در آنتی‌ژنهای مرتبط با واکسن و یا عدم کارایی واکسن و نیز پیشرفت در شناسایی و گزارش موارد عفونت، باشد. از سال ۱۳۷۰ تا ۱۳۸۵ شاهد کاهش موارد محتمل بیماری هستیم، درحالی‌که از سال ۱۳۸۶ به بعد این روند در کشور افزایش یافته است. گرچه در سال‌های اخیر با همکاری مرکز مدیریت بیماری‌ها و آزمایشگاه مرجع کشوری انسیتو پاستور ایران، پیشرفت‌های قابل توجهی در عرصه تشخیص و شناسایی بوردتلا پرتوسیس صورت گرفته است (۶).

باکتری یادشده فاکتورهای بیماری‌زایی متعددی را تولید می‌کند که به دودسته کلی توکسین‌ها و آدهزین‌ها تقسیم می‌شوند. ازجمله این فاکتورها می‌توان به

فیمریه، پرتاکتین، فیلامنتوس هماگلوتینین و سایتوتوکسین نایی اشاره کرد (۷). از طرفی توانایی تولید بیوفیلم توسط بوردتلا پرتوسیس به‌ویژه در مسیرهای تنفسی، می‌تواند پیامدهای متفاوتی همچون افزایش بقای باکتری در بدن میزبان را در پی داشته باشد. در ساختار بیوفیلم تولید اگزوپلی‌ساکاریدها افزایش‌یافته و به‌تبع این پدیده به‌نوعی افزایش اندازه کپسول باکتری رخ می‌دهد که منجر به حفاظت بیشتر از آن در برابر میزبان می‌شود (۸). درواقع بیوفیلم به تجمعات چند سلولی میکروبی متصل به سطح اطلاق می‌شود که اغلب به‌وسیله یک ماتریکس خودساخته یا مشتق شده از میزبان محصور است و عمدتاً با بیماری-زایی، استقامت در برابر فشارهای محیطی، سیستم ایمنی میزبان و مواد ضد میکروبی ارتباط دارد (۹). به عبارتی از بیوفیلم به‌عنوان عامل مهم مزمن شدن بیماری‌های باکتریایی یاد می‌شود و از باکتری در برابر هر دو نوع ایمنی ذاتی و اکتسابی میزبان حفاظت می‌کند (۱۰).

توسعه بیوفیلم یک فرآیند چندمرحله‌ای است که از اتصال باکتری به سطح آغازشده و با شکل‌گیری کلنی‌های کوچک ادامه می‌یابد تا درنهایت یک ساختار ۳ بعدی منظم ایجاد شود (۱۰). عوامل مختلفی در شکل‌گیری بیوفیلم بوردتلا پرتوسیس نقش دارند که از آن دسته می‌توان به این موارد اشاره کرد: سیستم انتقال سیگنال BvgAS (نقش در شکل‌گیری بیوفیلم)، فاکتورهای پروتئینی تنظیم‌کننده bvgAS (نقش در توسعه بیوفیلم)، فلاژل (به‌عنوان ساختار سطحی مانع کننده از Bvg، نقش در شکل‌گیری بیوفیلم)، ترکیبات ماتریکس (نقش در شکل‌گیری بیوفیلم) و لوکوس bpsA-D (۹).

جهت بررسی تشکیل بیوفیلم توسط یک باکتری از روش‌های مختلف فنوتیپی و ژنوتیپی استفاده می‌شود که برخی از این روش‌ها به مطالعه این پدیده در داخل بدن (*in vivo*) و برخی در خارج از بدن (*in vitro*) می‌پردازند. ازجمله فن‌هایی که توسط آن‌ها می‌توان تشکیل و یا عدم تشکیل و نیز تحلیل محتوای یک

(مشاهده با عدسی ۱۰۰) (۱۲).

تأیید هویت باکتری

کلنی‌های مشکوک را با استفاده از تست اکسیداز، کاتالاز، کیت API20E (biomerieux Marcy-l'Etoile, فرانسه) و آگلوتیناسیون اسلایدی با آنتی‌سرم (Difco, USA) بررسی کردیم که توسط آن‌ها تأیید نهایی باکتری صورت گرفت (۱۳، ۱۴).

در نهایت از میان تمامی نمونه‌های مشکوک سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۵، تعداد ۲۰ نمونه مثبت از نظر بوردتلا پرتوسیس تأیید شد.

بررسی تشکیل بیوفیلم

با استفاده از محیط مایع غنی اختصاصی جنس بوردتلا با عنوان SS broth (Stainer Scholte broth) استریل، یک سوسپانسیون از باکتری با کدورتی در حد نیم مک‌فارلند (به‌طوری‌که در طول موج ۶۰۰ نانومتر دارای OD تقریباً برابر با ۰/۱ باشد) درست کردیم. ۲۰۰ لاندا از سوسپانسیون حاصل از هر نمونه را در چاهک-های میکروپلیت استریل ۹۶ خانه‌ای تزریق کردیم (جهت اطمینان از نتیجه کار برای هر نمونه در ۳ چاهک سوسپانسیون ریخته شد). روی چاهک‌ها را پوشانده و به مدت ۹۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. پس از گذشت زمان یادشده ۲۰ دقیقه پلیت را آرام شیک کرده و با آب مقطر استریل شست‌وشو دادیم. ۲۰۰ لاندا رنگ کریستال ویوله ۰/۱٪ افزوده و پس از ده دقیقه شست‌وشو دادیم. جهت ثابت کردن سلول‌های رنگ‌شده ۲۰۰ لاندا اتانول ۹۶ درصد به چاهک‌ها اضافه کردیم. در نهایت با الیزاریدر و در طول موج ۵۴۰ نانومتر OD ها را خواندیم (۱۵). نتایج بر اساس جدول شماره ۱ تفسیر شدند.

جدول ۱. دسته‌بندی توانایی تشکیل بیوفیلم (۱۶)

نتایج حاصل از میانگین OD	محاسبه میزان حدنصاب	نتیجه
$OD \leq 0.303$	$OD \leq OD_c$	عدم تشکیل بیوفیلم
$0.303 < OD \leq 0.606$	$OD_c < OD \leq 2OD_c$	تشکیل بیوفیلم به صورت ضعیف
$0.606 < OD \leq 1.212$	$2OD_c < OD \leq 4OD_c$	تشکیل بیوفیلم به صورت متوسط
$OD > 1.212$	$OD > 4OD_c$	تشکیل بیوفیلم به صورت قوی

معیار) است که به عنوان OD cut off محسوب می‌شود (۱۶).

بیوفیلم را در شرایط ساکن و خارج از بدن مورد تحقیق قرار داد می‌توان به روش میکروتیتر پلیت، رابط هوا-مایع (ALI) و سنجش کلنی بیوفیلم اشاره کرد که در این بین روش اول یعنی استفاده از میکروتیتر پلیت یک تکنیک با مراحل انجام واضح تر و روشن تر است که توسط بسیاری از محققان در زمینه بیوفیلم و در مورد بسیاری از باکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (۱۱).

در پژوهش حاضر ما به جهت اهمیت موضوع تشکیل بیوفیلم توسط بوردتلا پرتوسیس و اثرات احتمالی آن بر میزبان و از این نظر که علیرغم اهمیت افزایش یافته این بیماری در سال‌های اخیر مطالعات کمی در مورد جوانب مختلف آن صورت گرفته است، بر آن شدیم تا توانایی سویه‌های مورد مطالعه از این باکتری را به روش in vitro biofilm formation و با استفاده از میکروتیتر پلیت مورد سنجش قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری

در شرایط استریل و ایمن (با استفاده از هود کلاس ۲ به همراه دستکش و ماسک)، سوآب داکرون‌های موجود در محیط انتقالی (ارسال شده از سراسر کشور به آزمایشگاه مرجع کشوری سیاه‌سرفه در انستیتو پاستور ایران) روی محیط کشت رگان لو (اختصاصی بوردتلا) کشت داده شدند. پلیت‌ها را در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد همراه با رطوبت قرار داده و نهایتاً تا ۱۰ روزه باکتری‌های احتمالی فرصت رشد دادیم. در صورت رشد کلنی خالص و مشکوک (کلنی‌های کوچک، براق، نقره‌ای رنگ)، ابتدا از آن‌ها روی لام گسترش تهیه کرده و پس از رنگ آمیزی گرم، از نظر وجود کوکوباسیل‌های گرم منفی بررسی کردیم

در جدول شماره ۱، ODc برابر با حاصل جمع OD میانگین نمونه کنترل منفی و ۳ برابر SD نمونه‌ها (انحراف

به‌عنوان کنترل مثبت از سویه بوردتلا پرتوسیس استاندارد Tohamal و برای کنترل منفی از محیط کشت SS broth بدون حضور باکتری و به‌تنهایی استفاده کردیم.

نتایج

براساس جدول شماره ۱، تمامی سویه‌های بوردتلا

جدول ۲. میانگین OD های نمونه‌های بیماران

تفسیر	OD میانگین	سویه‌ها
تشکیل بیوفیلم به شکل متوسط	$1/212 < OD \leq 0/606$	۲۰ سویه بالینی مورد مطالعه
تشکیل بیوفیلم به شکل قوی	۲/۲۱۵	Tohamal (کنترل مثبت)
عدم تشکیل بیوفیلم	۰/۰۶	کنترل منفی

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر که بر اساس روش *in vitro* biofilm formation و با استفاده از میکروپلیت تیترا انجام شده است، تمامی سویه‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم به شکل متوسط بودند. این تحقیق در مورد بوردتلا پرتوسیس برای اولین بار است که در ایران انجام می‌شود بنابراین پیشینه اطلاعاتی در ایران ندارد، اما در قیاس با مطالعات انجام گرفته در دیگر کشورها می‌توان گفت که در پژوهشی که توسط Arnal و همکاران (۲۰۱۵) و با روشی مشابه پژوهش حاضر صورت گرفت، مشخص گردید که سویه‌های مورد بررسی همگی قادر به تشکیل بیوفیلم هستند با این تفاوت که فرم شکل‌گیری بیوفیلم در آن‌ها قوی بود. در بررسی بعدی در همین مطالعه مشخص شد که سویه‌های مورد بررسی همگی دارای جهشی در ژن *bvgS* بودند که به نظر می‌آید در افزایش سرعت و میزان اتصال باکتری به سطوح مؤثر است و احتمالاً در این یافته که باکتری‌ها قویاً بیوفیلم تشکیل داده‌اند مؤثر باشد (۱۷). Bosch و همکاران (۲۰۰۶) در آزمایش *in vitro* biofilm formation که با استفاده از میکروسکوپ الکترونی به مشاهده مستقیم اتصالات برقرار شده پرداختند، نشان دادند که همه سویه‌های مورد بررسی قادر به تشکیل اتصالات محکم بیوفیلمی هستند (۸). Conover و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه خود که براساس آزمایش‌های *in vivo* روی موش انجام شد، نشان دادند

پرتوسیس مورد مطالعه، قادر به تشکیل بیوفیلم به شکل متوسط بودند. درواقع همان‌طور که در جدول شماره ۲ نشان داده شده است، تمامی میانگین OD های خوانده برای ۲۰ سویه مورد بررسی، اعدادی بین ۰/۶۰۶ و ۱/۲۱۲ بودند.

که سویه‌های مورد بررسی روی دیواره نازال موش ایجاد بیوفیلم می‌کنند و نیز مشخص گردید که با ایجاد موتاسیون در ژن مؤثر در ایجاد بیوفیلم مانند ژن‌های *لوکوس bps*، شکل‌گیری بیوفیلم دچار اختلال می‌شود (۱۸). در تحقیق Dorji و همکاران (۲۰۱۶) که سنجش *in vitro* biofilm formation با استفاده از میکروتیتر پلیت روی ۲۱ سویه بالینی بوردتلا پرتوسیس انجام شد، مشخص گردید که همه سویه‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم به شکل قوی هستند (۱۵). در پژوهش Mishra و همکاران (۲۰۰۵) که روی سویه‌ها استاندارد بوردتلا و با استفاده از میکروتیتر پلیت جهت سنجش تشکیل بیوفیلم انجام شد، نشان داده شد که با استفاده از این روش تشکیل بیوفیلم به‌خوبی قابل تشخیص است (۱۹). Parise و همکاران (۲۰۰۷) نیز با استفاده از روش مورد تحقیق حاضر موفق به سنجش بیوفیلم در سویه‌های استاندارد باکتریایی شدند و پس از آن با استفاده از سنجش‌های مرتبط با میکروسکوپ الکترونی و ایجاد موتاسیون‌های ژنی، نقش *لوکوس bpsA-D* را در تشکیل بیوفیلم تأیید کردند (۱۰). Sugisaki و همکاران (۲۰۱۳) به جهت ارزیابی بیوفیلم سویه‌های استاندارد، از پلیت ۱۲ خانه‌ای با لامل استفاده کردند و پس از خواندن چگالی نوری از لامل جهت مشاهده بیوفیلم‌ها با میکروسکوپ الکترونی استفاده کردند (۲۰).

مطالعه حاضر به جهت قدرت تشکیل بیوفیلیم در سویه‌های مورد مطالعه، مطابق تحقیقات مشابه در خارج از کشور است، اما به جهت اختلافی که در فرم تشکیل بیوفیلیم (ضعیف، متوسط و قوی) وجود دارد علت قاطعی نمی‌توان ذکر کرد چراکه قطعاً به بررسی‌های دقیق‌تری دارد و به‌ویژه به این علت که اولین بار در ایران است که چنین آزمایشی در مورد بوردتلا پرتوسیس انجام می‌شود و به تبع آن اولین بار است که از محیط پیچیده‌ای به نام SS broth استفاده می‌شود که ساخت آن نیازمند مهارت و زمان زیادی است، قطعاً جهت پی بردن به علت اختلاف سویه‌ها در فرم تشکیل بیوفیلیم، باید جوانب مختلفی مورد بررسی و تحقیق گیرند، از جمله شرایط رشد باکتری در محیط مایع غنی (به جهت پیچیدگی ساخت این محیط)، موتاسیون‌های ژنی سویه‌ها در ژن‌های مربوطه و غیره. بدین ترتیب بهتر است این آزمایش با روش‌های دیگری که قبلاً ذکر آن گذشت و یا در مقالات مربوطه یافت می‌شود، تکرار شود تا نتایج حاصل از این روش با روش‌های دیگر قابل قیاس باشد.

در حال بر اساس تحقیقات گذشته به نظر می‌رسد زمانی که محقق صرفاً می‌خواهد تشکیل و یا عدم تشکیل بیوفیلیم و نیز فرم تشکیل آن (ضعیف، متوسط و قوی) را مورد سنجش قرار دهد، استفاده از روش میکروتیتر پلیت روشی مناسب و کارا است؛ اما زمانی که بحث عوامل مؤثر بر تولید و توسعه بیوفیلیم مطرح است باید در کنار روش فوق، از روش‌هایی که بر پایه مشاهده با میکروسکوپ الکترونی و تکنیک‌های مشابه است استفاده شود.

در نهایت می‌توان گفت همان‌طور که پیش‌ازین مطرح شد بر اساس تحقیق حاضر مشخص گردید که تمامی سویه‌های بوردتلا پرتوسیس جدا شده از بیماران قادر به تشکیل بیوفیلیم هستند. این یافته هم می‌تواند به‌نوعی با شدت و عوارض بیماری ارتباط پیدا کند (۸) و هم اینکه شاید بتوان مقاومت آنتی‌بیوتیکی گزارش‌شده اخیر این باکتری در ایران (۲۱) و نیز در خارج از کشور را (۲۲) به موضوع بیوفیلیم ربط داد.

لذا با توجه به اهمیت بالای بیوفیلیم باکتریایی و نیز با عنایت به اینکه مطالعه حاضر برای اولین بار است که در ایران انجام می‌شود و روش‌های متعدد دیگری نیز در مورد ارزیابی بیوفیلیم وجود دارد، قطعاً نیازمند تحقیقات گسترده‌تری در این باره هستیم. در گام بعدی نیز می‌توان با دست‌کاری‌های ژنتیکی در ژن‌هایی که به نظر می‌آید مسئول تولید و توسعه بیوفیلیم هستند، بر نقش آن‌ها صحنه گذاشت و یا رد کرد. از طرفی طبق آنچه در باب تحقیقات دیگر محققان موجود است، مشخص است که غالب آن‌ها بیشتر به موضوع ژن‌های دخیل در تشکیل و توسعه بیوفیلیم پرداخته‌اند و به میزان کمتر در مورد فراوانی سویه‌های بالینی بوردتلا پرتوسیس قادر به تشکیل بیوفیلیم، مطالعه شده است. به همین علت قطعاً این موضوع به تحقیقات بیشتری نیاز دارد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد مصوب گروه میکروبی‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد است.

هم‌چنین از مساعدت و همکاری کارمندان و محققان آزمایشگاه مرجع کشوری سیاه‌سرفه در بخش باکتری-شناسی انستیتو پاستور ایران، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

1. Brooks GF, Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. 26 th. Vol. 53, New York: McGraw-Hill Medical; London: McGraw-Hill [distributor]. New York 2013; 877.
2. Sealey KL, Belcher T, Preston A. Bordetella pertussis epidemiology and evolution in the light of pertussis resurgence. Infection, Genetics and Evolution 2016;40:136-43.
3. Hegerle N. Epidemiology of whooping cough and typing of Bordetella pertussis. Future Microbiology 2013;8(11):1391-403.
4. Loch C. Pertussis: Where did we go wrong and what can we do about it? J Infect. 2016;
5. National Center for Immunization and Respiratory Diseases Pertussis (whooping cough), Fast Facts Centers for Disease Control and Prevention [Internet] 2015. Available from: <https://www.cdc.gov/pertussis/fast-facts.html>

6. Shahcheraghi F, NakhostLotfi M, Parzadeh M, Nikbin VS, Shouraj F, Zahraei SM. Isolation of Bordetella Pertussis and Bordetella Parapertussis of Clinical Specimens from Different Provinces of Iran 2012;22(88):2-8.
7. Fedele G, Bianco M, Ausiello CM. The virulence factors of bordetella pertussis: Talented modulators of host immune response. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz) 2013;61(6):445-57.
8. Bosch A, Serra D, Prieto C, Schmitt J, Naumann D, Yantorno O. Characterization of Bordetella pertussis growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. Applied Microbiology and Biotechnology 2006;71:736-47.
9. Cattelan N, Dubey P, Arnal L, Yantorno OM, Deora R. Bordetella Biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. Pathogens and Disease 2015.
10. Parise G, Mishra M, Itoh Y, Romeo T, Deora R. Role of a putative polysaccharide locus in Bordetella biofilm development. Journal of Bacteriology 2007;189(3):750-60.
11. Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA. Growing and Analyzing Static Biofilms. Current Protocols in Microbiology 2005;1(Unit 1B.1).
12. Loeffelholz MJ, Thompson CJ, Long KS, Gilchrist MJR. Comparison of PCR, culture, and direct fluorescent-antibody testing for detection of Bordetella pertussis. Journal of Clinical Microbiology 1999;37(9):2872-6.
13. Müller FMC, Hoppe JE, Wirsing Von König CH. Laboratory diagnosis of pertussis: State of the art in 1997. Journal of Clinical Microbiology 1997;35(10):2435-43.
14. Sedaghat M, Lotfi MN, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. Status of pertussis in Iran. Jundishapur Journal of Microbiology 2014;7(11).
15. Dorji D, Richmond P, Keil A, Mukkur T. Biofilm forming potential and antimicrobial susceptibility of newly emerged Western Australian Bordetella pertussis clinical isolates. Biofouling 2016;32(9):1141-52. 16.
16. Badmasti F, Siadat SD, Bouzari S, Ajdary S, Shahcheraghi F. Molecular detection of genes related to biofilm formation in multidrug-resistant Acinetobacter baumannii isolated from clinical settings. Journal of Medical Microbiology 2015;64(Pt 5):559-64.
17. Arnal L, Grunert T, Cattelan N, De Gouw D, Villalba MI, Serra DO, et al. Bordetella pertussis isolates from argentinean whooping cough patients display enhanced biofilm formation capacity compared to Tohama I reference strain. Frontiers in Microbiology 2015;6.
18. Conover MS, Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Deora R. The Bps polysaccharide of Bordetella pertussis promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. Molecular Microbiology 2010;77(6):1439-55.
19. Mishra M, Parise G, Jackson KD, Daniel J, Wozniak DJ, Deora R. The BvgAS Signal Transduction System Regulates Biofilm Development in Bordetella. Journal of Bacteriology 2005;187(4):1474-84.
20. Sugisaki K, Hanawa T, Yonezawa H, Osaki T, Fukutomi T, Kawakami H, et al. Role of (p)ppGpp in biofilm formation and expression of filamentous structures in Bordetella pertussis. Microbiology 2013;159:1379-89.
21. Mirzaei B, Bameri Z, Babaei R, Shahcheraghi F. Isolation of high level macrolide resistant Bordetella pertussis without transition mutation at domain V in Iran. Jundishapur Journal of Microbiology 2015;8(7):e18190.
22. Guillot S, Descours G, Gillet Y, Etienne J, Floret D, Guiso N. Macrolide-resistant bordetella pertussis infection in newborn girl, France. Emerging Infectious Diseases 2012;18(6):966-8.

Daneshtar
Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
25th Year, No.131
October- November
2017*

Received: 06/09/2017

Last revised: 22/10/2017

Accepted: 29/10/2017

An investigation of biofilm formation in *Bordetella Pertussis* isolates by *In vitro* biofilm formation method

Tayebe Shahbazi¹, Parviz Owlia², Farzad Badmasti³, Ali Badamchi³, Pouran Badiri⁴, Fereshteh Shahcheraghi^{3*}

1. Department of Microbiology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
2. Molecular Microbiology Research Center, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
3. Department of Bacteriology, Pasteur institute of Iran, Tehran, Iran.
4. Department of Genetics, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

*Corresponding author e-mail: shahcheraghifereshteh@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: *Bordetella pertussis* is a gram-negative cocobacilli bacterium and etiologic agent of whooping cough that in recent years, the number of its cases is on the rise. The ability of biofilm production helps this bacterium in interference with host immune system, severity of illness and antibiotic sensitivity. Thus, due to the importance of this factor, in this investigation, we tested the ability of *Bordetella pertussis* isolates in biofilm formation.

Materials and Methods: Nasopharyngeal samples were collected from persons who suspected whooping cough from throughout of Iran from 2014 to 2016 and were transferred to pertussis reference laboratory in Pasteur Institute of Iran. The bacterium in question was isolated by culture so that finally we had 20 positive samples. At the end, we performed *in vitro* biofilm formation test for isolated strains.

Results: All of the 20 clinical samples of *Bordetella pertussis* which in this study were examined could form biofilm and their final OD became between 0.606 and 1.212, the power of the biofilm made by them was intermediate.

Conclusion: Findings of this study was similar to researches conducted by other researchers, which showed the ability of the strains of *Bordetella pertussis* to form biofilm and to create adverse effects on the host for example antibiotic resistance, illness severity, and so on. Thus, considering the importance of this issue, more and broader researches are needed in this area.

Keywords: *Bordetella pertussis*, Biofilm, *In vitro* biofilm formation.