

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۴، تابستان ۱۳۹۴، صفحه ۸۳-۹۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۰۴

تأثیر کلرگزیدین بر بیوفیلم برخی باکتری‌های بیماری‌زای انسانی جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی

عزیزاله ابراهیمی کهریزسنگی: استادیار پاتوبیولوژی، دانشگاه شهرکرد، ایران، a_karizsangi@yahoo.com
زیبا شعبان پور: کارشناس ارشد باکتری‌شناسی، دانشگاه شهرکرد، ایران، z_sh1388@yahoo.com
سعید حبیبیان: دانشیار علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، ایران، habibian@vet.sku.ac.ir
رضا حکیمی آلنی*: دانشجوی دکتری باکتری‌شناسی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، r.hakimi91@basu.ac.ir
مجید همتی: کارشناس ارشد باکتری‌شناسی، دانشگاه شهرکرد، ایران، m_hemati1@yahoo.com
فاطمه افلاکیان: کارشناس ارشد باکتری‌شناسی، دانشگاه شهرکرد، ایران، fatemeh_aflakiyan@yahoo.com
مهدی دخت فرج: کارشناس ارشد باکتری‌شناسی، دانشگاه شهرکرد، ایران، shervindokhtfaraj@yahoo.com

چکیده

مقدمه: بیوفیلم‌ها جمعیتی از سلول‌های باکتری هستند که با تولید پلی‌مرهای خارج سلولی و ایجاد ماتریکس آگزوپلی ساکاریدی موجب اتصال برگشت‌ناپذیر باکتری‌ها به سطوح می‌شوند. ایجاد بیوفیلم باعث مقاومت باکتری نسبت به عوامل ضد میکروبی شده و می‌تواند به بروز مشکلات حاد در این زمینه منجر شود.

مواد و روش‌ها: بررسی حاضر با هدف ارزیابی تشکیل بیوفیلم در برخی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* (۱۳ مورد)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۳ مورد)، *انتروباکتر* (۱۳ مورد) و *اسیتوباکتر* (۱۳ مورد) جدا شده از عفونت‌های انسانی بیمارستان الزهرا اصفهان انجام گرفت. جدایه‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی تأیید شدند و در ادامه حداقل غلظت مهار کننده (MIC) کلرگزیدین و تأثیر آن بر روی رشد پلانکتونی و تشکیل بیوفیلم توسط این جدایه‌ها بررسی شد. تجزیه‌های آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزارهای SPSS نسخه ۲۰ و Excel انجام شد. **نتایج:** همه جدایه‌ها (۵۲ مورد) بیوفیلم تولید کردند. میانگین حداقل غلظت مهار کننده کلرگزیدین برای باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروباکتر* و *اسیتوباکتر* به ترتیب ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۰۱۳، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۰۳ گرم بر میلی‌لیتر بود. رشد پلانکتونی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروباکتر* در حضور کلرگزیدین در ۶۰ درصد موارد در MIC ۱/۴ و در ۴۰ درصد موارد در MIC ۱/۸ و برای باکتری‌های *اسیتوباکتر* و *استافیلوکوکوس اورئوس* ۴۰ درصد موارد در MIC ۱/۴ و ۶۰ درصد موارد در MIC ۱/۸ مهار شده بود. بیوفیلم در هیچ یک از رقت‌های MIC و ۲MIC تولید نشد، و با کاهش رقت ضد عفونی کننده قدرت تشکیل بیوفیلم به شکل معناداری افزایش پیدا کرد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج نشان داد که استفاده از کلرگزیدین در غلظت‌های مناسب (MIC) می‌تواند از تشکیل بیوفیلم در گونه‌های مختلف باکتری‌های عامل عفونت‌های بیمارستانی جلوگیری کند اما دوزهایی از کلرگزیدین که کم‌تر از MIC هستند می‌توانند محرک تولید بیوفیلم باشند.

واژه‌های کلیدی: بیوفیلم، کلرگزیدین، *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروباکتر*، *اسیتوباکتر*

مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی از علل شایع و مهم مرگ و میر و افزایش طول مدت بستری بیماران، افزایش هزینه‌های بیمارستانی و مشکلات بهداشتی هستند (۱). میکروارگانیسم‌های متفاوتی می‌توانند باعث بروز عفونت بیمارستانی به شکل اندمیک و اپیدمیک شوند با وجود این، باکتری‌ها ۹۰ درصد از عفونت‌های بیمارستانی را به خود اختصاص می‌دهند که در بین آن‌ها *اشریشیاکلی*^۱ شایع‌ترین عامل بیماری‌زا بوده و پس از آن *استافیلوکوکوس اورئوس*^۲ در مرتبه دوم قرار دارد (۲). *سودوموناس آئروژینوزا*^۳ یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی در طیف وسیعی از بیماران دارای نقص سیستم ایمنی شامل مبتلایان به بدخیمی‌ها، سیستمیک فیروزیس^۴ و سوختگی‌هاست (۳).

برای کنترل بیوفیلم باکتریایی با استفاده از ضدعفونی‌کننده‌ها پژوهش‌های زیادی انجام شده است. در بین این ضدعفونی‌کننده‌ها، کلرهگزیدین^۵ آنتی‌سپتیک است که بر طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و همچنین، برخی از قارچ‌ها و برخی از ویروس‌ها از جمله ویروس عامل ایدز و هپاتیت و بر بیوفیلم‌های باکتریایی مؤثر است (۴). از مزایای این آنتی‌سپتیک آن است که به سطح سوبستراهای زیادی بدون از دست دادن فعالیت ضدعفونی خود اتصال می‌یابد و همچنین، به آرامی آزاد می‌شود که این عمل به تداوم غلظت مؤثر آن در محیط منجر می‌شود (۵). دی‌استات کلرهگزیدین^۶ و دی‌گلوکونات کلرهگزیدین^۷، دو شکل نمکی کلرهگزیدین هستند که فعالیت شدید آنتی‌باکتریال^۸ دارند. دی‌گلوکونات کلرهگزیدین در آب و الکل

محلول بوده و از این رو در دهان شویه‌ها برای ممانعت از ایجاد پلاک دهان به کار می‌رود (۶). بیوفیلم توده‌ای از باکتری‌ها را در بر می‌گیرد که روی یک سطح جامد به یکدیگر می‌چسبند و بر روی هم اثر متقابل دارند. پیرامون آن‌ها را ماتریکس خارجی از جنس پلی ساکارید احاطه می‌کند (۷). بیوفیلم‌هایی که با یک گونه باکتری به وجود می‌آیند، مونوکالچر^۹ نامیده شده است ولی بیوفیلم‌های تشکیل شده روی سطوح مخاطی مانند روده که بیشتر آمیزه‌ای از گونه‌های گوناگونی از باکتری‌ها هستند را مولتی کالچر^{۱۰} گویند (۸). میکروب‌ها، بیوفیلم را در پاسخ به عوامل مختلفی تشکیل می‌دهند، که این عوامل ممکن است شامل شناسایی جایگاه‌های اتصال اختصاصی و یا غیر اختصاصی سلول بر روی یک سطح باشد و یا در برخی موارد، از طریق در معرض قرار گرفتن سلول‌های پلانکتونی در برابر غلظت‌های تحت‌مهماری آنتی‌بیوتیک‌ها انجام می‌گیرد (۹).

هدف اصلی این پژوهش بررسی تعیین حداقل غلظت مهماری^{۱۱} ضدعفونی‌کننده کلرهگزیدین بر بیوفیلم حاصل از برخی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اسیتوباکتر*^{۱۲} و *انتروباکتر*^{۱۳} جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های باکتریایی مشکوک به *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اسیتوباکتر* و *انتروباکتر* از آزمایشگاه میکروبیولوژی بیمارستان الزهرا اصفهان که از موارد عفونت‌های بیمارستانی بودند

مقدار از محیط تریپتوز سوی برات^{۱۷} (TSB) در گوده اول میکروپلیت مخلوط شد. سپس، عمل رقت‌سازی در گوده‌های دیگر انجام شد. در مرحله بعد، ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه نیم مک فارلند^{۱۸} باکتری مورد نظر با ۹/۹ میلی‌لیتر TSB استریل مخلوط شده و از این سوسپانسیون به مقدار ۵۰ میکرولیتر به هر گوده میکروپلیت اضافه شد. سرانجام میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

در ادامه به منظور بررسی اثر کلرهگزیدین بر رشد پلانکتونی باکتری و تشکیل بیوفیلم از جذب نوری^{۱۹} (OD) استفاده شد. برای بررسی اثر کلرهگزیدین بر رشد پلانکتونی باکتری‌ها، ابتدا از محیط کشت ۲۴ ساعته باکتری مورد نظر غلظت نیم مک فارلند تهیه شد. ۵۰ میکرولیتر از باکتری فوق و همین مقدار از رقت‌های مختلف کلرهگزیدین (رقت‌های MIC1:16، MIC1:8، MIC1:4، MIC1:2، MIC و MIC2) در هر چاهک مخلوط شد و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رشد پلانکتونی باکتری‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر^{۲۰} اندازه‌گیری شد. در بررسی تأثیر کلرهگزیدین بر ایجاد بیوفیلم باکتری‌ها از روش تندولکار و همکاران استفاده شد و غلظت‌های یاد شده کلرهگزیدین به گوده‌های میکروپلیت قبل از گرمخانه‌گذاری اضافه شد.

در انتها تجزیه و تحلی‌های آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزارهای SPSS نسخه ۲۰ و اکسل^{۲۱} انجام شد. مقایسه‌ی میانگین صفات با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن^{۲۲} در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

دریافت شده و برای انجام آزمون‌های تأییدی به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشکده دامپزشکی شهر کرد منتقل شد. آزمون‌های بیوشیمیایی مربوط به تأیید و تشخیص هر گونه بر اساس روش موجود در کتاب تکنیک‌های عملی در آزمایشگاه تشخیصی باکتری‌شناسی انجام گرفت (۱۰).

آزمایش بیوفیلم به روش تندولکار^{۱۴} و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام گرفت (۱۱). برای انجام این کار جدایه‌های مورد بررسی در محیط TSB به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از این مدت نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۴۰۰ RPM سانتریفیوژ و رسوب حاصل با ۵ میلی‌لیتر از TSB استریل مخلوط شد و جذب نوری سوسپانسیون حاصل در ۵۹۵ نانومتر به عدد ۱ رسانده شد. به هر ایزوله یک ردیف ۱۲ تایی از میکروپلیت اختصاص و به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده به آن اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محتویات میکروپلیت دور ریخته شده و سه مرتبه با فسفات بافر سالین^{۱۵} شستشو داده شد. در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله^{۱۶} ۲ درصد اضافه شد. ارزیابی تأثیر ماده ضد میکروبی در کاهش ضخامت بیوفیلم و میزان مرگ باکتری‌های بیوفیلم از طریق محاسبه جذب نوری انجام شد. در هر میکروپلیت یک ردیف به کنترل منفی اختصاص داده شد به این منظور محیط TSB خالص و بدون باکتری به هر گروه اضافه شد و تمامی مراحل یاد شده بر روی آن انجام گرفت.

برای تعیین حداقل غلظت مهار کننده کلرهگزیدین ۵۰ میکرولیتر از محلول ۱ درصد کلرهگزیدین، با همین

نتایج

نتایج حاصل از بررسی تولید بیوفیلم در جدول ۱ ارائه شده است. در این روش ابتدا میزان OD نمونه و تراکم نوری کنترل منفی^{۳۳} (ODc) محاسبه شد و بر حسب کمتر یا بیشتر بودن میزان OD به ODc، در چهار گروه فاقد بیوفیلم ($OD \leq ODc$)، بیوفیلم ضعیف ($ODc < OD \leq 2 ODc$)، بیوفیلم متوسط ($2OD < OD < 4 ODc$) و بیوفیلم قوی ($OD > 4ODc$) قرار گرفتند. نکته قابل توجه عدم تشکیل بیوفیلم ضعیف در سودوموناس آئروژینوزا بود. برای تعیین MIC از جدایه‌هایی استفاده شد که بیوفیلم متوسط تا قوی را تشکیل داده بودند. آزمایش‌ها

در ۳ نوبت تکرار شد. MIC که برابر است با پایین‌ترین غلظت مهارکننده که مانع از رشد قابل مشاهده باکتری می‌شود پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. نتایج میزان MIC ضد عفونی‌کننده کلرهگزیدین بر چهار باکتری سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروباکتر و اسیتوباکتر به ترتیب ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۰۱۳، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۰۳ گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. نتایج تأثیر کلرهگزیدین بر رشد پلانکتونی در چهار باکتری مورد مطالعه انجام گرفت. نتایج به شکل خلاصه در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱- بررسی تولید بیوفیلم

عنوان	بیوفیلم ضعیف	بیوفیلم متوسط	بیوفیلم قوی
استافیلوکوکوس اورئوس	۴ (۳۱ درصد)	۸ (۶۲ درصد)	۱ (۷ درصد)
سودوموناس آئروژینوزا	صفر	۸ (۶۲ درصد)	۵ (۳۸ درصد)
انتروباکتر	۳ (۲۳ درصد)	۶ (۴۶ درصد)	۴ (۳۱ درصد)
اسیتوباکتر	۲ (۱۲ درصد)	۵ (۳۸ درصد)	۶ (۴۶ درصد)

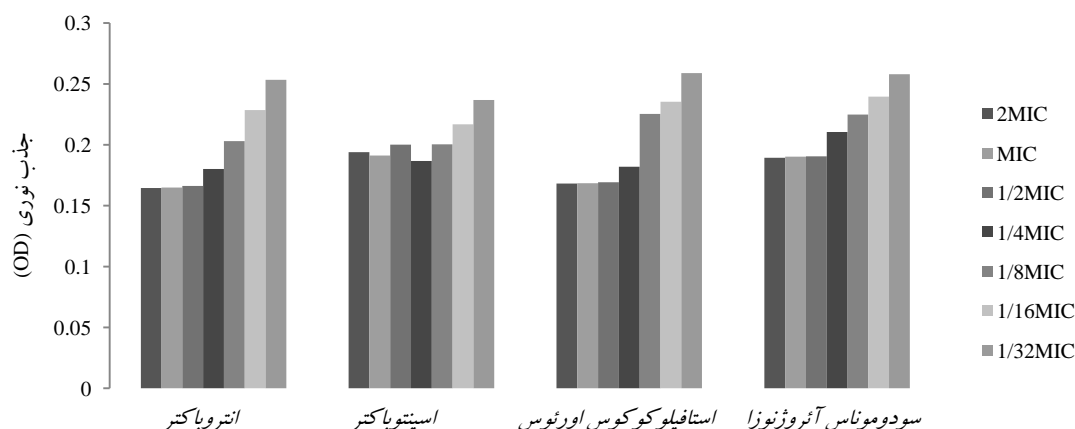
جدول ۲- رشد پلانکتونی در حضور ضد عفونی‌کننده کلرهگزیدین

باکتری	2 MIC	MIC	MIC 1:2	MIC 1:4	MIC 1:8	MIC 1:16
سودوموناس آئروژینوزا	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	۴	۶	-
استافیلوکوکوس اورئوس	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	۴	۶	-
انتروباکتر	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	۶	۴	-
اسیتوباکتر	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	۴	۶	-

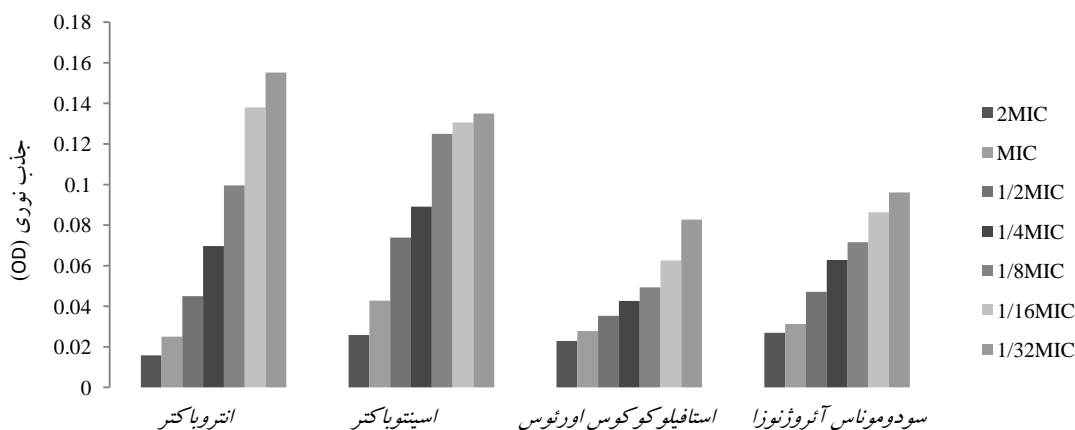
* اعداد نشانگر تعداد ایزوله‌های رشد یافته است.

از کاهش غلظت مهارکننده کلرهگزیدین و به دنبال آن افزایش رشد باکتری‌هاست. همچنین، جذب نوری در بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به بقیه باکتری‌ها خیلی کمتر بود که این نشان دهنده حساسیت زیاد این باکتری به کلرهگزیدین است (شکل ۲).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین رشد پلانکتونی و بیوفیلمی چهار باکتری مورد بررسی در معرض رقت‌های مختلف کلرهگزیدین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن به شکل جداگانه در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. به جز در اسیتوباکتر، در بقیه باکتری‌ها با کاهش MIC میزان جذب نوری زیاد می‌شود که ناشی



شکل ۱- میانگین رشد پلانکتونی باکتری‌ها در حضور ضد عفونی کننده کلر هگزیدین



شکل ۲- میانگین رشد بیوفیلم باکتری‌ها در حضور ضد عفونی کننده کلر هگزیدین

افزایش رشد پلانکتونی و به دنبال آن افزایش OD به شکل معنادار (در سطح $P \text{ value} \leq 0.05$) انجام شده است. برای بررسی وجود رابطه بین رشد پلانکتونی و بیوفیلمی چهار باکتری مورد مطالعه، از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. با محاسبات انجام شده ضریب همبستگی بین رشد پلانکتونی و بیوفیلمی برابر 0.579 به دست آمد. بنابراین، در سطح احتمال ۹۹ درصد بین رشد پلانکتونی و بیوفیلمی آن‌ها رابطه معناداری وجود داشت و با افزایش رشد پلانکتونی، میزان رشد بیوفیلمی نیز افزوده می‌شد.

میزان افزایش کدورت گوده‌های مربوط به باکتری‌های یاد شده نسبت به گوده حاوی رقت MIC در جدول‌های ۳ و ۴ نمایش داده شده است. در جدول ۳ با افزایش غلظت کلر هگزیدین میزان جذب نوری هم زیاد شده است که در واقع به این خاطر است که با رقیق شدن کلر هگزیدین افزایش تشکیل بیوفیلم در گوده‌های میکروپلیت انجام شده و به دنبال آن جذب رنگ کریستال ویوله توسط این بیوفیلم‌ها زیاد شده است. در نتیجه در مرحله رنگ بری میزان زیادی از این رنگ در گوده‌ها آزاد شده و افزایش OD را سبب شده است. همچنین، در جدول ۴ هم با رقیق شدن کلر هگزیدین

جدول ۳- درصد افزایش OD در غلظت‌های مختلف کلر هگزیدین نسبت به غلظت MIC در مرحله رشد بیوفیلمی

نام باکتری	غلظت اولیه	جدایه باکتری									
		۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱
انتروباکتر	MIC : 2/1	۱۶/۷۶	۴۱/۱۸	۲۰/۵۷	۵۶/۹۵	۱۹/۴۱	۱۳/۶۸	۱۶/۷۶	۱۲/۵۸	-۱۴/۹	-۱۷/۵
	MIC : 4/1	۳۷/۱۲	۳۸/۷۰	۶۹/۲۳	۶۵/۴۷	۶۰	۲۳/۳۶	۲۶/۵۳	۳۶/۲۳	۷/۶۹	-۱۰
	MIC 8/1 :	۵۵	۵۷/۵۸	۸۱/۰۸	۷۶/۸۸	۵۰/۷۱	۴۱/۴۳	۳۶/۸۴	۴۸/۲۴	۳۶/۹۶	۶/۷۸
	MIC 16/1 :	۶۵/۳۰	۵۹/۰۲	۸۴/۲۳	۸۵/۶۳	۶۴/۲۹	۵۰	۴۴/۸۳	۵۶/۸۶	۶۶/۴۸	۲۶/۴۲
	MIC 32/1 :	۶۹/۳۰	۶۱/۳۳	۸۴/۷۸	۸۷/۱۵	۶۵/۰۸	۵۹	۵۴/۸۶	۶۴/۸۰	۶۹/۴۳	۳۸/۷۲
اسیتوباکتر	MIC : 2/1	۸/۶۱	۱۲/۸۰	۶/۱۱	۷۱/۹۲	۸/۷۰	۴/۸۳	۸/۹۵	۸/۹۲	۱/۳۵	۴/۰۰
	MIC : 4/1	۱۹/۵۸	۳۰/۱۹	۲۵/۱۳	۶۲/۸۸	۲۲/۲۲	۴۸/۳۱	۱۶/۴۳	۳۹/۰۲	۸/۷۱	۱۸/۰۹
	MIC 8/1 :	۲۴/۵۱	۷۵/۴۴	۳۲/۷۲	۶۶/۷۸	۲۹/۷۱	۵۷/۸۰	۳۱/۳۸	۴۱/۳۹	۱۴/۴۰	۲۰/۵۳
	MIC 16/1 :	۳۰/۴۷	۴۴/۰۰	۴۱/۶۰	۶۷/۰۸	۴۳/۶۲	۵۹/۵۳	۵۶/۰۲	۶/۵۴	۲۴/۱۴	۷۴/۵۲
	MIC 32/1 :	۳۴/۷۵	۴۸/۳۶	۴۳/۸۵	۶۷/۵۵	۴۹/۷۰	۶۱/۰۲	۵۶/۹۱	۴۶/۳۴	۳۵/۴۸	۳۲/۷۷
استافیلوکوکوس اورئوس	MIC : 2/1	۱۶/۳۰	۷/۶۳	۱۸/۱۸	۱۴/۲۹	۴/۷۶	۲۴/۲۹	۷/۵۱	۵/۷۳	۱۰/۲۴	۱۰/۶۹
	MIC : 4/1	۲۵/۴۹	۹/۴۵	۲۳/۰۸	۰/۵۰	۱۵/۶۱	۳۵/۴۰	۱۲/۰۹	۳۲/۱۱	۴۴/۹۳	۱۲/۸۸
	MIC 8/1:	۳۲/۳۳	۲/۱۳	۲۶/۲۳	۲۴/۷۱	۳۰/۸۰	۴۲/۳۹	۱۷/۵۳	۳۶/۴۸	۲۸/۷۵	۳۷/۱۷
	MIC 16/1 :	۴۲/۷۷	۲۳/۰۸	۳۰/۵۰	۳۰/۷۷	۳۶/۷۱	۵۰/۲۳	۳۴/۶۹	۵۲/۵۶	۳۶/۶۷	۴۷/۶۰
	MIC 32/1 :	۴۳/۲۸	۳۱/۳۴	۳۲/۵۸	۳۲/۷۸	۴۰/۸۳	۶۱/۱۷	۴۴/۴۴	۷۷/۲۰	۴۶/۴۸	۵۴/۷۸
سودوموناس آئروژینوزا	MIC : 2/1	۳۶/۳۱	۱۴/۲۹	۳۶/۲۵	۴۳/۴۳	۷/۴۶	۱۸/۶۹	۷/۱۴	۹/۴۷	۱۸/۳۷	۰/۴۶
	MIC : 4/1	۴۳/۵۰	۳۳/۸۶	۴۱/۷۱	۵۱/۷۰	۴۹/۱۸	۲۴/۲۸	۱۰/۳۴	۱۹/۳۸	۲۷/۲۷	۲۷/۰۹
	MIC : 8/1	۴۸/۱۹	۴۶/۵۰	۵۱/۶۶	۵۷/۸۶	۴۲/۶۶	۲۶/۸۰	۳۰/۸۵	۳۳/۹۵	۳۳/۰۵	۳۰/۳۵
	MIC 16/1 :	۴۰/۳۰	۶۷/۸۲	۵۷/۸۵	۶۴/۵۹	۶۰/۳۴	۳۰/۷۷	۴۲/۴۸	۳۶/۷۶	۴۴/۰۶	۳۳/۵۴
	MIC : 32/1 :	۶۰/۲۴	۷۲/۲۸	۳۶/۶۵	۶۶/۷۴	۶۲/۲۷	۳۶/۳۳	۴۹/۰۲	۲۹/۴۳	۴۹/۳۷	۴۱/۸۷

جدول ۴- درصد افزایش OD در غلظت‌های مختلف کلر هگزیدین نسبت به غلظت MIC در مرحله رشد پلانکتونی

نام باکتری	غلظت اولیه	جدایه باکتری									
		۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱
انتروباکتر	MIC : 1/2	۰/۴۵	۰/۸۳	۰/۲۵	۰/۵۳	۰/۳۵	-۰/۴۲	۱/۳۶	۰/۳۲	-۰/۴۶	۰/۵۰
	MIC : 1/4	۳/۵۲	۳/۳۴	۱۱/۱۶	۳/۶۳	۱/۰۶	۴/۴۴	۶/۲۱	۲/۸۴	۵/۸۲	۲/۸۶
	MIC : 1/8	۲۱/۷۵	۱۴/۸۴	۱۵/۴۶	۷/۶۵	۴/۵۰	۷/۲۴	۹/۱۶	۴/۴۵	۹/۳۲	۷/۸۵
	MIC : 1/16	۳۰/۳۷	۱۶/۸۱	۲۰/۴۰	۱۰/۸۳	۱۲/۹۴	۱۲/۳۰	۲۱/۵۵	۱۲/۵۸	۱۰/۵۷	۱۱/۳۳
	MIC : 1/32	۳۴/۰۳	۲۳/۲۶	۲۸/۷۲	۲۰/۲۴	۱۷/۶۶	۱۴/۹۰	۲۳/۳۹	۱۴/۵۲	۱۵/۷۱	۱۷/۰۷
استافیلوکوکوس اورئوس	MIC : 1/2	۰/۱۱	-۰/۶۹	-۰/۴۷	-۱/۲۷	۰/۸۵	-۰/۲۰	۱/۰۵	۰/۶۱	۱/۲۸	۰/۹۴
	MIC : 1/4	۳/۳۹	۵/۶۹	۳/۵۰	۲/۱۱	۲/۶۱	۵/۱۶	۶/۳۴	۳/۵۵	۴/۲۳	۱/۴۱
	MIC : 1/8	۵۶/۶۸	۸/۹۲	۶/۳۶	۵/۹۱	۱۱/۲۴	۸/۱۵	۸/۷۸	۸/۵۱	۸/۹۳	۳/۷۶
	MIC : 1/16	۲۳/۵۲	۱۱/۵۸	۱۱/۳۹	۷/۴۸	۲۰/۰۷	۱۷/۳۳	۱۶/۹۴	۱۵/۱۸	۱۳/۹۹	۴/۹۸
	MIC : 1/32	۲۷/۱۳	۱۴/۱۷	۱۳/۷۳	۱۳/۷۱	۲۴/۱۰	۳۹/۹۹	۱۹/۵۵	۲۰/۵۵	۲۲/۵۴	۷/۸۱
سودوموناس آئروژینوزا	MIC : 1/2	۰/۳۹	۰/۱۹	۰/۵۹	-۰/۵۹	-۰/۶۱	-۰/۳۶	۰/۰۷	۰/۰۰	۰/۱۷	۰/۱۷
	MIC : 1/4	۴/۱۱	۵/۶۰	۵/۸۵	۸/۰۳	۴/۱۷	۷/۰۹	۱/۱۲	۱/۲۱	۵/۵۲	۸/۸۴
	MIC : 1/8	۵/۲۴	۵/۸۵	۷/۹۰	۱۰/۵۵	۴/۷۳	۱۳/۱۱	۴/۵۸	۶/۲۸	۱۱/۶۲	۱۲/۲۰
	MIC : 1/16	۶/۵۵	۸/۴۱	۱۶/۱۳	۸/۸۳	۸/۶۹	۱۹/۹۴	۷/۲۷	۷/۸۹	۱۸/۷۲	۱۵/۲۶
	MIC : 1/32	۸/۲۲	۱۱/۸۸	۲۴/۷۲	۱۴/۹۸	۱۱/۷۱	۲۱/۰۳	۹/۶۹	۱۳/۱۰	۲۲/۲۴	۱۹/۰۸

بحث و نتیجه گیری

عفونت‌های بیمارستانی از علل شایع و مهم مرگ و میر و افزایش طول مدت بستری بیماران هستند (۱۲). سودوموناس آئروژینوزا و اسیتوباکتر بیش‌ترین عوامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی به ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه هستند که مقاومت وسیع آنتی‌بیوتیکی و توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند (۱۳).

بیوفیلم انتروکوک‌ها در طیف وسیعی از وسایل پزشکی که معمولاً بیماران بستری با آن در ارتباط هستند، یافت می‌شود و احتمالاً یکی از عوامل ابتلا به عفونت‌های بیمارستانی است (۱۴). توانایی تشکیل بیوفیلم در استافیلوکوکوس‌ها از عوامل مهم مزمن شدن عفونت‌های ناشی از این باکتری‌هاست که اهمیت زیادی در پزشکی و دامپزشکی دارد (۱۵).

برای تشخیص بیوفیلم، روش‌های مختلفی مانند میکروسکوپ الکترونی نگاره^{۲۴} (نمونه‌های بالینی)، روش‌های هیبریدیزاسیون^{۲۵} DNA و رنگ آمیزی اختصاصی ماتریکس و غیره وجود دارد (۱۶). در این بررسی که ابتدا قدرت تشکیل بیوفیلم در نمونه‌های باکتریایی استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، اسیتوباکتر و انتروباکتر به روش میکروتیتر پلیت انجام گرفت، همه جدایه‌ها بیوفیلم ایجاد کردند که کم‌ترین قدرت تشکیل بیوفیلم مربوط به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، و بیش‌ترین قدرت تشکیل بیوفیلم مربوط به باکتری سودوموناس آئروژینوزا بود. این میزان تشکیل بیوفیلم در مورد سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتر با نتایج سوماریا^{۲۶} و همکارانش در سال ۲۰۱۲ مطابقت داشت (۱۷).

پژوهشگران به علت اهمیت بیوفیلم در ایجاد بیماری‌ها و مقاومت دارویی در جستجوی راه‌های

مناسبی برای مهار و پیشگیری از تشکیل بیوفیلم هستند. که در این مورد می‌توان به استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف (۱۸)، شلاتور کننده‌های فلزی (۱۹)، مواد ضدباکتریایی مانند ان-استیل سیتوزین^{۲۷} (۲۰)، عسل (۲۱)، کرم (۲۲)، و در نهایت، به مهار کننده‌های کوپوروم سنسینگ^{۲۸} (۱۶) و غیره اشاره کرد. در این پژوهش نیز به آثار ضد بیوفیلمی ماده ضد عفونی کننده کلرهگزیدین پرداخته شده است که یک ضد عفونی کننده با طیف اثر گسترده، ارزان و در دسترس است (۲۳). برای این کار میزان MIC کلرهگزیدین بر روی جدایه‌های مربوط به هر ۴ باکتری مورد مطالعه که بیوفیلم قوی و متوسط داشتند محاسبه شد. در این میان اسیتوباکتر کم‌ترین میزان MIC (۰/۰۰۰۳ گرم بر میلی‌لیتر) را به خود اختصاص داد. بقیه جدایه‌ها با میزان MIC کمتر از ۰/۰۰۱ بودند که با نتایج منگیستو^{۲۹} و همکاران در سال ۱۹۹۹ (۲۴) و گرار^{۳۰} و همکاران در سال ۲۰۱۰ مطابقت داشت (۲۵).

در مرحله تعیین میزان اثر کلرهگزیدین بر رشد پلانکتونی، که به شکل مرئی گزارش شد طبق تحلیل آماری داده‌ها، میانگین رشد پلانکتونی جدایه‌های مورد مطالعه در غلظت‌های MIC 2، MIC، و MIC1:2 هیچ گونه رشدی وجود نداشت و از غلظت MIC1:4 به بعد، رشد هر چهار باکتری گزارش شد که از این نظر با نتایج ابراهیمی^{۳۱} و همکاران در ۲۰۱۴ مطابقت داشت (۲۶). همچنین، در مطالعه‌ای که توسط هندیانی^{۳۲} و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت از ۷۴ جدایه بالینی اسیتوباکتر بومانی^{۳۳}، ۱۳ درصد (۱۰ مورد) بیوفیلم قوی ایجاد کردند (۲۷) که در مقایسه با نتایج پژوهش حاضر (۴۶ درصد) میزان پایینی است که احتمالاً مربوط به اختلاف در گونه باکتری و شرایط محیطی می‌باشد. در

کننده کلرهگزیدین بر روی رشد پلانکتونی اتروباکتر بیشتر از بیوفیلم آن است (۳۴).

در پایان، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که استفاده از ضدعفونی‌کننده‌ها (کلرهگزیدین) در غلظت‌های مناسب می‌تواند از رشد و توسعه گونه‌های مختلف باکتریایی جلوگیری کند اما دوزهایی از ضدعفونی‌کننده که کم‌تر از MIC هستند می‌توانند محرک تولید بیوفیلم باشند. در نهایت، می‌توان گفت که درمان بیوفیلم هنوز یکی از مشکلات مهم بشر به حساب می‌آید و نیاز پژوهش و مطالعه بیشتری در این زمینه وجود دارد. با در نظر گرفتن اینکه از بین بردن بیوفیلم‌ها پس از تشکیل، کار سخت و طاقت‌فرساست بهتر است از تشکیل بیوفیلم جلوگیری شود.

References

- (1) Ernst R.K., Adams K.N., Moskowits S.M., Kraig G.M., Kawasaki K., Stead C.M. The *Pseudomonas aeruginosa* lipid A deacylase: selection for expression and loss within the cystic fibrosis airway. *Journal of Bacteriology* 2006; 188 (1): 191- 201.
- (2) Schaberg D.R., Culver D.H., Gaynes R.P. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *American Journal of Medicine* 1991; 91 (3): 72- 75.
- (3) Levin A.S., Barone A.A., Penço J., Santos M.V., Marinho J.S., Arruda E.A., et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Infectious Diseases* 1999; 28 (5): 1008- 11.

این پژوهش می‌توان گفت که برای مهار رشد هر چهار باکتری یاد شده به غلظتی بالاتر از MIC نیازی نبود و این غلظت از کلرهگزیدین، در مهار رشد باکتری‌های یاد شده به شکل مؤثری عمل کرد.

برای کنترل بیوفیلم باکتریایی، بایستی MIC مواد ضدباکتریایی علاوه بر روی حالت پلانکتونیک، بر روی بیوفیلم حاصله نیز بررسی شود زیرا ممکن است میزان MIC برای یک باکتری در حالت بیوفیلمی تا ۱۰۰ برابر بیشتر از حالت پلانکتونی باشد (۲۸). در پژوهش حاضر نیز اثر کلرهگزیدین بر تشکیل بیوفیلم در هر کدام از چهار باکتری یاد شده انجام شد و نتایج نشان داد که درصد افزایش OD در مرحله رشد بیوفیلمی بیشتر از مرحله رشد پلانکتونی است که این ناشی از مقاومت بالای باکتری در این مرحله می‌باشد. علت مقاومت می‌تواند ناشی از ایجاد فنوتیپ تطبیقی (۱۹)، وجود ساختار گلیکو کالیکس در اطراف سلول‌های بیوفیلم و قدرت چسبندگی سلول‌های بیوفیلم (۲۹)، انتقال ژن‌های مقاومتی در بین سویه‌ها و نیز در بین باکتری‌های مختلف (۳۰)، بیان ژن‌های مقاومتی مختلف (۳۱)، کاهش متابولیسم و آهسته شدن رشد (۳۲) در حالت بیوفیلم باشد.

در رابطه با این مورد، در پژوهشی که تاکنو^{۳۴} و همکاران در سال ۱۹۹۴ تحت عنوان اثر ضدعفونی‌کننده‌ی کلرهگزیدین روی بیوفیلم و رشد پلانکتونی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* انجام دادند، نتایج بدست آمده نشان داد که بیوفیلم دارای مقاومت بیشتری نسبت به سلول‌های پلانکتونی است (۳۳). هوی کانگ^{۳۵} و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که اثر ضدعفونی

- (4) Yousefi Mashouf R., Nazari M., Shams M. Evaluation of efficacy of the current disinfectants on *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals of Hamadan in 2006. *Tabib_e_shargh* 2007; 8 (1): 287- 96.
- (5) Manau-Navarro C., Guasch-Serra S. Métodos de control de placa bacteriana. In: Cuenca E., Manau C., Serra L.L. *Odontología Preventiva y Comunitaria: Principios Métodos y Aplicaciones*. 2nd ed. Barcelona: Masson; 2003: 69- 88.
- (6) Barthel CR., Zimmer S., Zilliges S., Schiller R., Göbel U.B., Roulet J.F. In situ antimicrobial effectiveness of chlorhexidine and calcium hydroxide: gel and paste versus gutta-percha points. *Journal of Endodontics* 2002; 28 (6): 427- 30.
- (7) Wolf G., Crespo J.G. Optical and Spectroscopic method for biofilm examination and monitoring. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 2002; 1 (3): 227- 51.
- (8) Nowroozi J. *General Bacteriology*. 1st ed. Tehran: Jafari Publications; 2011.
- (9) Jenkins S., Addy M., Wade W. The mechanism of action of chlorhexidine. *Journal of Clinical Periodontology* 1988; 15 (7): 415- 24.
- (10) Mahbad A., Mohamadi M., Hamidi Fard M. *Practical techniques for the laboratory diagnosis of bacterial and virology*. 3rd ed. Tehran: Ketab Mir; 2007.
- (11) Tendolkar P.M., Baghdayan A.S., Gilmore MS. Enterococcal surface protein: Esp Enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity* 2004; 72 (10): 6032- 9.
- (12) Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45 (4): 999-1007.
- (13) Delissalde F., Amábile-Cuevas CF. Comparison of antibiotic susceptibility and plasmid content, between biofilm producing and non-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2004; 24 (4): 405- 08.
- (14) Kristich C.J., Li Y.H., Cvitkovitch D.G., Dunny G.M. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology* 2004; 186 (1): 154- 63.
- (15) Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell DE., Korber DR., Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* 1995; 49 (1): 711- 45.
- (16) Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2010; 35 (4): 322- 32.
- (17) Sharma V., Nainan M.T., Shivanna V. The effect of cavity disinfectants on the sealing ability of dentin bonding system: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry* 2009; 12 (3):109- 13.
- (18) Mulla Summaiya A. Assessment of biofilm formation by the causative organisms of ventilator associated pneumonia at intensive care unit of a tertiary care hospital. *National Journal of Medical Research* 2012; 2 (1): 15- 8.
- (19) Tre-Hardy M., Vanderbist F., Traore H., Devleeschouwer M.J. In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2008; 31 (4): 329- 36.
- (20) Turakhia M.H., Cooksey K.E., Characklis W.G. Influence of calcium-specific chelant on biofilm removal. *Applied and Environmental Microbiology* 1983; 46 (5): 1236- 8.
- (21) Roberts M.E., Stewart P.S. Modeling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology* 2005; 151: 75- 80.
- (22) Dunford C., Cooper R., Molan P., White R. The use of honey in wound management. *Nursing Standard* 2000; 15 (11): 63- 8.
- (23) Van der Plas M.J., Jukema G.N., Wai S.W., Dogterom-Ballering H.C., Lagendijk E.L., Van Gulpen C., et al. Maggot excretions/secretions are differentially

- effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; 61 (1): 117- 22.
- (24) Mengistu Y., Erge W., Belle B. In vitro susceptibility of gram-negative bacterial isolates to chlorhexidine gluconate. *East African Medical Journal* 2009; 76 (5): 243- 6.
- (25) Grare M., Dibama H.M., Lafosse S., Ribon A., Mourer M., Regnouf-de-Vains JB., et al. Cationic compounds with activity against multidrug-resistant bacteria: interest of a new compound compared with two older antiseptics, hexamidine and chlorhexidine. *Clinical Microbiology* 2010; 16 (5): 432- 38.
- (26) Ebrahimi A., Hemati M., Dehkordi SH., Bahadoran S., Khoshnood S., Khubani S., et al. Chlorhexidine Digluconate Effects on Planktonic Growth and Biofilm Formation in Some Field Isolates of Animal Bacterial Pathogens. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 2014; 9 (2): e14298.
- (27) Hendiani S., Abdi-Ali A., Mohammadi P. Comparison of two methods for quantification of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Biological Journal of Microorganism* 2014; 2 (8): 51- 8.
- (28) Sandoe JA., Wysome J., West A.P. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006; 57 (4):767- 70.
- (29) Brown M.L., Aldrich H.C., Gauthier J.J. Relationship between glycocalyx and povidone-iodine resistance in *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) biofilms *Applied and Environmental Microbiology* 1998; 1 (1995): 187- 93.
- (30) Vu B., Chen M., Crawford R.J., Ivanova EP. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 2009; 14 (7): 2535- 54.
- (31) Dibdin G.H., Assinder S.J., Nichols W.W., Lambert P.A. Mathematical model of β -lactam penetration into a biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* while undergoing simultaneous inactivation by released β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1996; 38 (5): 757- 69.
- (32) Keren I., Kaldalu N., Spoering A., Wang Y., Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS microbiology letters* 2004; 230 (1): 13- 18.
- (33) Takeo Y., Oie S., Kamiya A., Konishi H., Nakazawa T. Efficacy of disinfectants against biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbios* 1993; 79 (318): 19- 26.
- (34) Hoikynung K., Ryu J.H., Beuchat L.R. Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension dride on the surface of stainless steel and in a biofilm. *Applied and environmental microbiology* 2007; 73 (4): 1256- 65.

¹- *Escherichia Coli*

²- *Staphylococcus aureus*

³- *Pseudomonas aeruginosa*

⁴- Cystic Fibrosis

⁵- Chlorhexidine

⁶- Chlorhexidine diacetate

⁷- Chlorhexidine digluconate

⁸- Antibacterial

⁹- Mono culture

¹⁰- Multi culture

¹¹- minimum inhibitory concentration

¹²- *Acinetobacter*

¹³- *Enterobacter*

¹⁴- Tendolkar

¹⁵- Phosphate buffered saline

¹⁶- Crystal violet

¹⁷- Tryptic Soy Broth

¹⁸- McFarland

¹⁹- Optical density

²⁰- Elisa Reader

²¹- Excel

²²- Duncan

²³- Optical Density Control

²⁴- Scanning electron microscope

²⁵- DNA Hybridization

²⁶- Summaiya

²⁷- N - acetyl cytosine

²⁸- Quorum sensing

²⁹- Mengistu

³⁰- Grare

³¹- Ebrahimi

³²- Hendiani

³³- *A. baumannii*

³⁴- Takeno

³⁵- Hoikyung

Chlorhexidine effect on bacterial biofilms isolated from nosocomial infections

Aziz alah Ebrahimikahrizangi

Assistant Professor of Pathoniology, Shahrekord university, Shahrekord, Iran, a_karizangi@yahoo.com

Ziba Shabanpour

M.Sc. of Bacteriology, Shahrekord university, Shahrekord, Iran, z_sh1388@yahoo.com

Saeed Habibian

Associate Professor of Pathoniology, Shahrekord university, Shahrekord, Iran, habibian@vet.sku.ac.ir

Reza Hakimi alni*

Ph.D. Student of Bacteriology, University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran, r.hakimi91@basu.ac.ir

Majid Hemati

M.Sc. of Bacteriology, Shahrekord university, Shahrekord, Iran, m_hemati1@yahoo.com

Fatemeh Aflakiyan

M.Sc. of Bacteriology, Shahrekord university, Shahrekord, Iran, fatemeh_aflakiyan@yahoo.com

Mahdi dokhtefaraj

M.Sc. of Bacteriology, Shahrekord university, Shahrekord, Iran, shervindokhtefaraj@yahoo.com

Abstract

Introduction: Biofilms are population of bacteria cells that cause irreversible binding to the surfaces by producing extracellular polymers. Biofilm formation in bacteria causes resistance to antimicrobial agents and can lead to severe problems in this ground.

Materials and methods: The purpose of this study was to evaluate biofilm formation in some isolates of *Pseudomonas aeruginosa* (13 case), *Staphylococcus aureus* (13 case), *Enterobacter* (13 case) and *Acinetobacter* (13 case) which were collected from human infections of Alzahra hospital in Isfahan. Also the minimum inhibitory concentration of chlorhexidine and its impact on the growth of planktonic and biofilm formation for these isolates were determined. Statistical analysis and graphing have been carried out by using SPSS software (version 20) and Excel.

Results: All isolates (52 isolates) have produced biofilm. The mean of MIC of chlorehexidine antiseptic for the *p.aeruginosa*, *S.aureus*, *Enterobacter* and *Acinetobacter* were 0/001, 0/00013, 0/001, 0/0003 g/ml respectively. Planktonic bacterial growth inhibition from *p.aeruginosa* and *Enterobacter* in 1/4 MIC and 1/8 MIC respectively was seen in 40 and 60 % cases. *Acinetobacter* and *Staphylobacter aureus*, have been controlled in 40 % of cases in 1/4 MIC and 60 % of cases in 1/8 MIC. Biofilm has not been produced in any of MIC and 2MIC dilution, and the power of biofilm formation had been increased significantly by reducing concentration of chlorhexidine dilution.

Discussion and conclusion: The results indicate that the use of chlorhexidine in appropriate concentrations (MIC) can prevent bacterial growth and biofilm formation in different species causing hospital infections, but doses of chlorhexidine that are less than the MIC can stimulate biofilm formation.

Key words: Biofilm, Chlorhexidine, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*

* Corresponding author

Received: April 30, 2014 / **Accepted:** June 25, 2014