مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۲ شماره ۱ بهار ۱۳۸۷، صفحات ۲۳-۳۰

اثر آنتی‌بیوتیک های کینولونی بر بیوفیلم‌های تولید شده بوسیله سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری

مینو توکلی*[۱]، محمدرضا صعودی[۲]، فریدون ملک زاده[۳]، غزاله حاجی زرقانی[۱]

۱) دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
۲) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه الزهرا
۳) گروه میکروبیولوژی، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران
نویسنده رابط: مینو توکلی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات همراه: ۰۹۱۲۶۷۸۴۷۸۴ minoo _Tavakkoli @ yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۲/۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۲۹

چکیده:

زمینه و اهداف: سلول های باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به طور طبیعی بر روی پوست و غشاءهای مخاطی بدن انسان زندگی می‌کند و نیز یکی از عوامل مهم عفونت‌های nosocomial (عفونت‌های بیمارستانی) می‌باشد. توانایی تشکیل بیوفیلم نقش مهمی در ویرولانس این باکتری دارد. کینولون‌ها از دسته آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که برای سالیان متمادی، برای درمان عفونت‌های ادراری ایجاد شده توسط *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به کار برده شده اند. با توجه به مقاومت برتر سلول‌های ساکن ساختارهای بیوفیلمی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در مقایسه با سلول‌های پلانکتونیک، مطالعه مقاومت بالای سویه‌های بومی مولد بیوفیلم *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* هدف این بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در این پژوهش، ۱۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بومی از بیماران مبتلا به عفونت ادراری جدا شد و همچنین سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* PTCC 1435 به عنوان کنترل به کار رفت. شناسایی ایزوله‌ها بوسیله آزمایش‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی مورد تایید قرار گرفت. به دنبال آن آزمون‌های سنجش حساسیت باکتری علیه ۳ آنتی‌بیوتیک کینولونی (سیپروفلوکساسین)(CP) ، افلوکساسین(OFX) و نالیدیکسیک اسید(NA) به دو روش دیسک‌گذاری (Kirby – Baure) و تهیه غلظت در لوله (Broth dilution test) انجام شد.

یافته‌ها: میانگین حداقل تراکم بازدارنده MIC (Minimum Inhibitory Concentration) این آنتی بیوتیک ها برای ۱۰ ایزوله بدست آمده به این صورت بدست آمد: سیپروفلوکساسین ۷/۳۷۵ µg/µl، افلوکساسین ۱۱/۵۳ µg/µl و نالیدیکسیک اسید ۲۵۹/۲ µg/µl . سپس مدلی تجربی برای تولید بیوفیلم در شرایط آزمایشگاهی طراحی شد و از این ایزوله‌ها، بیوفیلم به دست آمد. سپس MIC این ۳ آنتی‌بیوتیک علیه شکل بیوفیلم ایزوله‌ها تعیین شد. مدل تجربی بیوفیلم افزایش مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک ها را نشان داد: از ۱۵ برابر افزایش مقاومت در برابر نالیدیکسیک اسید تا ۱۸ برابر در مقابل سیپروفلوکساسین. میانگین MIC آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، نالیدیکسیک اسید علیه شکل بیوفیلم۱۰ ایزوله به ترتیب برابر ۱۲۸/۴ µg/µl ، ۱۷۷/۸ µg/µl و ۳۹۴۲/۴ µg/µl بود.

نتیجه‌گیری: *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* افزایش مقاومت در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های کینولونی مختلف در ساختار بیوفیلم نسبت به شکل پلانکتونیک نشان داد. نتایج حاصل از این پژوهش بر روی سویه های بومی با نتایج حاصل از پژوهش‌های مشابه در دیگر سویه ها همخوانی دارد و بر مصرف دوز کافی آنتی بیوتیک ها در درمان عفونت‌های ادراری ناشی از بیوفیلم تاکید دارد.

کلیدواژه ها: باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، بیوفیلم، عفونت ادراری، کینولون

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه :

استافیلوکوکوس ها باکتری های گرم مثبت و کروی شکل بوده که به صورت خوشه های نامنظمی قرار می گیرند (شکل a-۱). این باکتری ها در محیط های کشت تکثیر یافته و دارای فعالیت متابـولیکی شدیدی هستند، کربوهیدرات ها را تخمیر کرده و پیگمان هایی به رنگ سفید تا زرد پررنگ (طلایی) تولید می کنند. جنس استافیلوکوک حداقل ۳۲ گونه را در بردارد . ۳ گونه عمده آن که در پزشکی اهمیت دارند شامل استافیلوکوکوس اورئوس *(s.aureus)* ، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (S.epidermidis)* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس (S.saprophyticus)* می باشند (۱) .

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جزء فلور طبیعی پوست می باشد ولی گاهی با تشکیل بیوفیلم سبب ایجاد عفونت هایی می شود (۲). بیـوفیلم، بـاکتری را در برابر آنتی بیوتیک هـا، آنتی بادی ها و سلول های فاگوسیتر مقاوم می کند (۳و۴). این باکتری کواگولاز تولید نکرده، DNase منفی، ترهالوز و مانیتول منفی می باشند (۵). این باکتری به ندرت چرک تولید کرده اما گاهی ضایعات چرکی را بعد از اعمال جراحی ارتوپدی یا قلب و عروق یا بیماری های دیگری را در افراد مبتلا به نارسایی ایمنی ایجاد می کند. همچنین این باکتری باعث ایجاد عفونت در افرادی می شود که از سوند ادراری استفاده می کنند (۱و۲و۶) *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مهمترین و فراوان ترین گونـه هـای باکتریـایی جدا شده مسبب عفـونت هـای خون بیمارستانی (nosocomial) است (۷و۸). آنتی بیوتیک ها مواد شیمیایی هستند که توسط میکروارگانیسم ها تولید می شوند و رشد سایر میکروارگانیسم هـا را متـوقف ساخته یـا سرانجـام آنها را از بیـن می بـرند (۹) . کینـولون ها از دسته آنتی بیوتیک هایی هستند که برای سالیان متمادی جهت درمان عفونت های دستگاه ادراری بکار برده می شوند (۹). محل اثر کینولون ها، آنزیم DNA gyrase و توپوایزومراز IV می باشد و کینولون ها با مهار DNA جیراز باعث مهار همانند سازی می شوند (۱۰و۱۱و۱۲). یکی از دلایل مقاومت استافیلوکوکوس ها در برابر کینـولـون ها، جهش در منطقـه ژن های gyrA و grlA (همه سویه ها) و ژن های gyrB و grlB (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*) می باشد (۱۳). *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* پلی ساکارید خارج سلولی تولید می کند که باعث تشکیل بیوفیلم می شود و این بیوفیلم در ایجاد عفونت های این باکتـری بسیـار موثر می باشد (۱۴و۱۵). بیـوفیلم نه تنها میکروارگانیسم های تشکیل دهنده آن را از تیمار بهداشتی محافظت می کند بلکه محلی برای مبادله مواد ژنتیکی است (۱۶).

با توجه به اینکه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در حالت بیوفیلم دارای مقاومت بیشتری در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها نسبت به حالت پلانکتونیک می‌باشد، بررسی MIC (Minimum Inhibitory Concentration) آنتی‌بیوتیک‌های کینولون (سیپروفلوکساسین، افلوکساسین و نالیدیکسیک اسید) (آنتی‌بیوتیک‌های درمان کننده عفونت ادراری استافیلوکوکی) علیه حالت پلانکتونیک و همچنین حالت بیوفیلم این باکتری بررسی شد تا بتوان MIC و دوز مؤثر این آنتی‌بیوتیک‌ها را برای از بین بردن سویه‌های بومی این باکتری در شکل بیوفیلم به دست آورد. هدف از انجام این پژوهش علاوه بر کمک به معرفی دوز موثر آنتی بیوتیک های کینولونی، هشدار دیگری در زمینه افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در میان سویه های بیماریزای فرصت طلب باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بوده است. این هشدار از یک سویه باید در تعیین دوز موثر دارو مورد توجه قرار گیرد و از سویه دیگر بر بکارگیری روش های موثر بهداشتی به منظور پیشگیری از رخداد آلودگی به هنگام اعمال جراحی و یا انواع دیگر مواجهه با بیماران تاکید می نماید.

مواد و روش ها :

تهیه نمونه: در این تحقیق ۱۰ سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* از بیماران مبتلا به عفونت ادراری جدا شد وهمچنین سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* PTCC 1435 از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شد.

تهیه آنتی بیوتیک: آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و افلوکساسین به صورت پودر از شرکت داروسازی رازک تهیه گردید و آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید به صورت پودر از شرکت البرز دارو تهیه شد. این پودرها پس از تهیه در جای خنک، دور از نور و در مجاورت جاذب رطوبت سیلیکاژل نگهداری شدند.

آزمون های سنجش حساسیت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک: در این تحقیق از ۲ روش استفاده شد.

روش دیسک گذاری (Kirby –Bauer –Disk Method) در محیط مولر هینتون آگار: در این روش ، در یک لوله استریل که حاوی ۳-۲ میلی لیتر محیط کشت MHB (مولر هینتون براث) بود، یک لوپ از کلنی های ۲۴ ساعته باکتری مورد نظر سوسپانسیون و شیکر شد تا یکنواخت گردد ، به منظور استاندارد نمودن، کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده با لوله شماره ۰/۵ مک فارلند تنظیم شد. کدورت لوله ۰/۵ مک فارلند برابر کدورت

Archive of SID

www.SID.ir

تعداد تقریبی $۱/۵ \times ۱۰^{۸} CFU/ml$ سلول می باشد. سپس با کمک سوآب استریل از سوسپانسیون تهیه شده برداشت شد و بر روی محیط MHA (مولر هینتون آگار) بصورت متراکم کشت داده شد سپس دیسک های آنتی بیوتیکی بر روی محیط با رعایت فاصله دیسک ها از یکدیگر گذاشته شد سپس پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت گرما گذاری شدند. بعد از این مدت زمان قطر هاله عدم رشد با خط کش اندازه گیری شد (۱۷).

تعیین MIC به روش تهیه رقت در لوله (Broth dilution test): برای تعیین MIC این آنتی بیوتیک ها از روش تهیه رقت در لوله (Broth dilution test) استفاده شد(۱۸). در این روش از ۱۸ لوله استفاده شد و سری رقت آنتی بیوتیکی از محلول stock آنتی بیوتیک با غلظت ۲۰۴۸ میکرو گرم در میلی لیتر تهیه شد (در هر لوله ۱ میلی لیتر محلول آنتی بیوتیک وجود داشت) سپس به هر لوله ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری با کدورت $۱۰^{۵} CFU/ml$ که در محیط MHB تهیه شده بود اضافه گردید. سپس لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ^{o}C ۳۷ قرار داده شدند . نتایج پس از ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. اولین لوله رقت که شفاف مانده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

تولید بیوفیلم: برای تولید بیوفیلم از قطعاتی از سوند ادراری به طول ۱ سانتی متر از جنس لاتکس استفاده شد و از سیم های آلیاژ نیکل و کروم به عنوان داربست استفاده شد و مجاور سازی باکتری در سطح بستر درون فلاسک های در پیچ دار ۲۵۰cc حاوی ۹۰cc محیط کشت براث در ۱۸ شرایط مختلف صورت گرفت. در این پژوهش برای بدست آوردن شرایط بهینه تولید بیوفیلم، سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* PTCC 1435 تحت شرایط ۲ محیط کشت مختلف Trypton soy broth (TSB) و مولر هینتون براث (MHB) و در انکوباتور ^{o}C ۳۷ بدون شیکر، شیکر دار با دور ۱۲۰rpm و شیکردار با دور ۱۸۰rpm و طی مدت زمان های ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت برای تولید بیوفیلم قرار گرفت مقدار تلقیح باکتری در همه شرایط ذکر شده ، ۱۰ml سوسپانسیون باکتری در محیط کشت MHB یا TSB با کدورت تقریبی $۱۰^{۷} CFU/ml$ در فلاسک حاوی ۹۰ cc محیط کشت MHB یا TSB بود. به این ترتیب هر فلاسک حاوی ۱۰۰ cc سوسپانسیون باکتری با کدورت تقریبی $۱۰^{۶} CFU/ml$ شد. پس از گذشت مدت زمان های ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت ، وجود و تشکیل بیوفیلم بر روی سوند ادراری توسط ۲ روش برداشت نمونه از روی سوند و کشت برروی محیط MHB یا TSB آگار و روش اسپکتروفتومتری فنول سولفوریک اسید سنجیده شد.

روش برداشت نمونه از سوند: در این روش بعد از طی مدت زمان مورد نظر، سوند از فلاسک توسط یک پنس استریل بیرون آورده شد وتوسط آب مقطر استریل (جهت شسته شدن باکتری های پلانکتونیک) ۳ بار شستشو داده شد سپس توسط سواب استریل مرطوب شده با آب مقطر استریل روی سوند محکم اسکراب شد، سپس توسط این سواب بر روی پلیت های حاوی محیط MHA یا TSB آگار کشت صورت گرفت، بعد از ۲۴ ساعت که پلیت ها در انکوباتور ^{o}C ۳۷ قرار داده شدند، مورد بررسی قرار گرفتند. رشد بر روی محیط آگار پس از ۲۴ ساعت نشان دهنده وجود بیوفیلم بر روی سوند ادراری بود.

روش اسپکتروفتومتری فنول سولفوریک اسید: حساسیت این روش μg ۶۰ -۱ گلوکز در μl ۲۰۰ می باشد .

معرف های موجود در این روش شامل : فنول ($\%5 w/v$) و اسید سولفوریک غلیظ می باشد. *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، پلی ساکارید خارج سلولی تولید می کند که این پلی ساکارید باعث بهم چسبیدن باکتری ها به یکدیگر و تولید بیوفیلم می شود. پس از مدت زمان های لازم برای تولید بیوفیلم در مدل تجربی طراحی شده، سوندها از فلاسک ها خارج شده و پس از ۳ بار شستشو توسط آب مقطر استریل هر یک درون لوله ای استریل منتقل شدند مقدار μl ۲۰۰ آب مقطر استریل به هر یک از لوله ها اضافه شد و μl ۲۰۰ فنول ۵٪ به هر لوله اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه نمونه ها رها شدند و بعد از شیک شدید و گذشت مدت زمان ۳۰ دقیقه جذب رنگ زرد ایجاد شده در محلول ها، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰nm خوانده شد. این رنگ زرد نشان دهنده تشکیل بیوفیلم است. برای سنجیدن مقدار گلوکز این جذب ها، نمودار استاندارد گلوکز بر اساس ۱۰۰-۱ میکروگرم گلوکز در ۲۰۰ میکرولیتر تهیه شد. و مقدار تشکیل بیوفیلم نمونه ها بدست آمد. با توجه به نتایج بدست آمده، مشخص شد که شرایط بهینه تولید بیوفیلم در مدل تجربی طراحی شده ما به صورت استفاده از محیط TSB و گرما گذاری در انکوباتور ^{o}C ۳۷، بدون شیک شدن، برای مدت زمان ۷۲ ساعت می باشد. پس از بدست آوردن شرایط بهینه تولید بیوفیلم ، تعداد ۱۰ سویه بیماستانی تحت این شرایط بهینه قرار گرفتند و تولید بیوفیلم کردند.

تعیین MIC آنتی بیوتیک های کینولوی بر روی بیوفیلم باکتریها: در این مرحله غلظت های MIC آنتی بیوتیک در شکل پلانکتونیک

Archive of SID

www.SID.ir

و ۱۰ غلظت بالاتر از MIC، بر روی بیوفیلم های تشکیل شده بر روی سوند ادراری آزمایش شد. در این روش برای هر سویه، ۱۱ قطعه سوند ادراری با طول ۱/۵ سانتی متر برداشته وتولید بیوفیلم تحت شرایط بهینه انجام شد. سپس ۱۱ فلاسک در پیچ دار برداشته شد سری رقت آنتی بیوتیکی تهیه شد به صورتی که هر فلاسک حاوی ۲۰ میلی لیتر محلول آنتی بیوتیک و ۲۰ میلی لیتر محیط کشت مولر هینتون براث بود و غلظت آنتی بیوتیکی در هر فلاسک نصف غلظت فلاسک قبلی بود. آخرین فلاسک حاوی غلظت MIC آنتی بیوتیک برای شکل پلانکتونیک باکتری بود. سپس هر قطعه از سوند پس از ۳ بار شستشو برای شسته شدن باکتری های پلانکتونیک به یک فلاسک منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور $37\ ^{o}C$ نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت، اولین فلاسکی که شفاف باقی مانده بود و همچنین سوند موجود در آن پس از اسکراب کردن با سواب استریل وکشت بر روی محیط آگار رشد نکرد، به عنوان MIC تعیین گردید. لازم به ذکر است که کدورت ایجاد شده در فلاسک ها به علت مقاومت بیوفیلم در برابر آنتی بیوتیک و کنده شدن قسمت هایی از بیوفیلم و رشد در محیط براث می باشد.

یافته ها:

تعیین حساسیت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های کینولون: بعد از ۲۴ ساعت با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد مشخص شد که سویه ها حساسیت بیشتری به سیپروفلوکساسین نسبت به افلوکساسین و حساسیت بیشتری به افلوکساسین نسبت به نالیدیکسیک اسید نشان دادند. اکثر سویه ها نسبت به نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند. همچنین سویه های بیمارستانی در مقایسه با سویه استاندارد PTCC 1435 ، نسبت به آنتی بیوتیک ها مقاوم تر بودند (جدول۱).

تعیین MIC آنتی بیوتیک های کینولون: بعد از ۲۴ ساعت، آخرین لوله ای که شفاف باقی مانده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد. MIC این آنتی بیوتیک ها برای سویه PTCC 1435 برابر: برای آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین، لوله شماره ۱۵ با رقت $\mu g/ml$ ۰/۰۶۲۵، برای افلوکساسین، لوله شماره ۱۴ با رقت $\mu g/ml$ ۰/۱۲۵ و برای نالیدیکسیک اسید لوله شماره ۶ با رقت $\mu g/ml$ ۳۲ بود. MIC سویه های بیمارستانی در جدول ۲ ذکر شده است که نشان دهنده مقاوم تر بودن این سویه ها نسبت به سویه استاندارد PTCC 1435 بود.

تولید بیوفیلم: با توجه به شرایط مختلفی که برای تولید بیوفیلم در نظر گرفته شد، مشخص شد که باکتری در محیط TSB نسبت به محیط MHB، بیوفیلم بیشتری تولید می کند. محیط TSB شامل پپتون از کازئین، پپتون از soy meal، گلوکز و کلرید سدیم می باشد. محیط MHB شامل عصاره گوشت، کازئین هیدورلیز شده و نشاسته است. پس باکتری با استفاده از گلوکز موجود در محیط TSB ، پلی ساکارید خارج سلولی بیشتری تولید می کند. همچنین با گذشت مدت زمان بیشتر و عدم شیک شدن، باکتری قادر به تولید بیوفیلم بیشتری می باشد. مقدار تولید بیوفیلم توسط سویه استاندارد PTCC 1435 در شرایط مختلف در جدول ۳ و همچنین مقدار تولید بیوفیلم تحت شرایط بهینه توسط سویه های بیمارستانی در جدول ۴ ذکر شده است.

تعیین MIC آنتی بیوتیک های کینولونی علیه شکل بیوفیلم باکتری: بعد از ۲۴ ساعت مشخص شد که MIC آنتی بیوتیک ها بر روی شکل بیوفیلم سویه های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مورد آزمایش ۱۸-۱۵ برابر و یا حتی بیشتر نسبت به MIC این آنتی بیوتیک ها علیه شکل پلانکتونیک سویه های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بود و سویه ها در شکل بیوفیلم در مقابل آنتی بیوتیک ها، مقاومت بیشتری نشان می دادند (جدول ۴).

جدول ۱: آنتی بیوگرام نمونه ها به روش دیسک دیفیوژن (Kirby –Baure)

سویه ها	سیپروفلوکساسین		افلوکساسین		نالیدیکسیک اسید	
PTCC 1435	S	۲۵ mm	S	۲۰ mm	*	۱۲ mm
سویه ۱	S	۲۱ mm	S	۱۷ mm	*	۱۰ mm
سویه ۲	S	۲۳ mm	S	۱۹ mm	*	۱۲ mm
سویه ۳	S	۱۷ mm	S	۱۴ mm	R	عدم هاله
سویه ۴	S	۲۰ mm	S	۱۷ mm	*	۹ mm
سویه ۵	S	۱۸ mm	S	۱۴ mm	R	عدم هاله
سویه ۶	S	۱۷ mm	S	۱۵ mm	*	۱۱ mm
سویه ۷	S	۱۹ mm	S	۱۶ mm	R	عدم هاله
سویه ۸	S	۱۶ mm	S	۱۴ mm	R	عدم هاله
سویه ۹	S	۱۴ mm	S	۱۳ mm	R	عدم هاله
سویه ۱۰	S	۲۲ mm	S	۱۸ mm	*	۱۰ mm

S :حساس *: نیمه حساس R: مقاوم

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲: MIC آنتی بیوتیک ها علیه شکل پلانکتونیک سویه ها به روش تهیه رقت در لوله (Broth dilution test)

سویه ها	سیپروفلوکساسین	افلوکساسین	نالیدیکسیک اسید
PTCC 1435	۰/۰۶۲۵ $\mu g/ml$	۰/۱۲۵ $\mu g/ml$	۳۲ $\mu g/ml$
سویه ۱	۰/۵ $\mu g/ml$	۰/۲۵ $\mu g/ml$	۶۴ $\mu g/ml$
سویه ۲	۰/۲۵ $\mu g/ml$	۰/۱۲۵ $\mu g/ml$	۳۲ $\mu g/ml$
سویه ۳	۸ $\mu g/ml$	۱۶ $\mu g/ml$	۱۲۸ $\mu g/ml$
سویه ۴	۰/۵ $\mu g/ml$	۲ $\mu g/ml$	۱۲۸ $\mu g/ml$
سویه ۵	۴ $\mu g/ml$	۸ $\mu g/ml$	۲۵۶ $\mu g/ml$
سویه ۶	۸ $\mu g/ml$	۱۶ $\mu g/ml$	۶۴ $\mu g/ml$
سویه ۷	۴ $\mu g/ml$	۸ $\mu g/ml$	۵۱۲ $\mu g/ml$
سویه ۸	۱۶ $\mu g/ml$	۳۲ $\mu g/ml$	۲۵۶ $\mu g/ml$
سویه ۹	۳۲ $\mu g/ml$	۳۲ $\mu g/ml$	۱۰۲۴ $\mu g/ml$
سویه ۱۰	۰/۵ $\mu g/ml$	۱ $\mu g/ml$	۱۲۸ $\mu g/ml$

جدول ۳: مقدار تشکیل پلی ساکارید نمونه ها (تشکیل بیوفیلم) در شرایط مختلف از سویه PTCC بر اساس نمودار استاندار (μg Polysacaride/1cm catheter)

محیط کشت	بدون شیکر	شیکر با دور ۱۲۰rpm	شیکر با دور ۱۸۰rpm	زمان(h)
TSB	۵۳/۷۲	۴۷/۸۴	۳۹/۱۱	۲۴h
	۷۰/۴۹	۶۳/۸۲	۵۹/۹۰	۴۸h
	۹۱/۳۷	۶۸/۹۲	۴۹/۴۱	۷۲h
MHB	۱/۶۶	۱/۱۷	۰/۹۸	۲۴h
	۳۳/۳۳	۲۱/۵۶	۱۷/۹۴	۴۸h
	۶۰/۵۸	۴۳/۵۳	۳۴/۴۱	۷۲h

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴: مقدار تولید بیوفیلم سویه ها تحت شرایط بهینه و MIC آنتی بیوتیک های کینولونی بر روی شکل بیوفیلم سویه ها به روش تهیه رقت

سویه ها	مقدارتولید پلی ساکارید تشکیل دهنده بیوفیلم تحت شرایط بهینه بر اساس منحنی استاندارد ($\mu g\ Polysacaride/_{1cm\ catheter}$)	MICآنتی بیوتیکهای کینولونی بر روی شکل بیوفیلم سویه ها به روش تهیه رقت.		
		سیپروفلوکساسین ($\mu g/ml$)	افلوکساسین ($\mu g/ml$)	نالیدیکسیک اسید ($\mu g/ml$)
PTCC 1435	۹۱/۳۷	۱	۲	۵۱۲
سویه ۱	۸۷/۲۵	۸	۸	۲۰۴۸
سویه ۲	۷۸/۷۲	۸	۲	۵۱۲
سویه ۳	۹۰/۲۹	۲۵۶	۲۵۶	۲۰۴۸
سویه ۴	۶۹/۲۱	۱۶	۳۲	۲۰۴۸
سویه ۵	۸۸/۳۳	۶۴	۶۴	۲۰۴۸
سویه ۶	۷۸/۷۲	۱۲۸	۲۵۶	۱۰۲۴
سویه ۷	۸۶/۹۶	۳۲	۱۲۸	۸۱۹۲
سویه ۸	۹۰	۲۵۶	۵۱۲	۴۰۹۶
سویه ۹	۹۲/۱۵	۵۱۲	۵۱۲	۱۶۳۸۴
سویه ۱۰	۶۴/۸۰	۴	۸	۱۰۲۴

شرایط بهینه : استفاده از محیط TSB ، انکوباتور ۳۷°c و مدت زمان ۷۲ ساعت

بحث:

با توجه به اهمیت بیوفیلم باکتریایی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در ایجاد بیماری های عفونی از قبیل عفونت های ادراری، عفونت در دریچه های قلب مصنوعی، عفونت های خون بیمارستانی (nosocomial)، در این پژوهش بررسی اثر آنتی بیوتیک های کینولون بر روی شکل بیوفیلم این باکتری و مقایسه این MIC با MIC این آنتی بیوتیک ها بر روی شکل پلانکتونیک این باکتری مورد بررسی قرار گرفت. و همچنین شرایط بهینه تولید بیوفیلم از این باکتری در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. در این مطالعه ، از دو محیط MHB یا TSB و همچنین مدت زمان و وجود یا عدم وجود شیکینگ برای تولید بیوفیلم بررسی شد.

در پژوهشی که Hussain M و همکاران در سال ۱۹۹۲ انجام دادند اثرات متفاوت شرایط محیطی شامل تراکم گاز اکسیژن (هوا) و دی اکسید کربن و ترکیب کشت بر تولید بیوفیلم را بررسی کردند. نتایج نشان داد که مقدار لعاب (پلی ساکارید خارجی) جدا شده از یک سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* کشت داده شده در یک محیط سنتزی با ترکیب شیمیایی معین (HHW) در حضور هوا نسبت به مقدار تولید این لعاب در هر دو محیط HHW و محیط سنتزی دیالیزی SDF (Synthetic dialysis fluid) در حضور هوا به همراه 5% CO_2 ناچیز بود. وجود یک سطح فیزیولوژیکی CO_2 در طی کشت در محیط TSB (Tryptonsoy broth)، از تشکیل لعاب جلوگیری کرد. تولید بیوفیلم در SDF و HHW ترجیح داده شد اما در TSB و مایع دیالیز شده صفاقی (Peritoneal dialysis fluid) وقتی که هوا با 5% CO_2 استفاده شد، ضعیف شد (۱۶) .

در پژوهشی دیگر برای تولید بیوفیلم از باکتری *پسودوموناس آئروجینوزا* از محیط کشت TSB استفاده شد(۱۹).

اکثریت سلول ها در یک بیوفیلم به طور ضروری نسبت به کشته شدن نسبت به سلول های پلانکتونیک مقاوم نیستند و وقتی با یک آنتی بیوتیک کشنده که می تواند سلول های با رشد آهسته را بکشد تیمار شوند، به طور سریع می میرند، سلول های پایداری کننده، زنده باقی می مانند و بوسیله حضور یک آنتی بیوتیک که رشد آنها را مهار می کند ، باقی می مانند(۲۰و۲۱) .

Archive of SID

www.SID.ir

در مطالعه دیگر نشان داده شده که مقاومت باکتری های *استافیلوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در بیوفیلم های درهم گیسخته نسبت به مقاومت آنها در بیوفیلم های سالم در غلظت های MIC آنتی بیوتیک ها برابر است. در غلظت های بالاتر، باکتری ها در بیوفیلم های درهم گیسخته به طور قابل توجه مقاومت کمتری نسبت به آنهایی که در بیوفیلم سالم هستند نشان دادند (P<0/001) اما نسبت به سلول های پلانکتونیک مقاوم تر بودند. Quinupristin/dalfopristin نشان دادند که بهترین فعالیت در مقابل سلول های بیوفیلم های درهم گیسخته در غلظت های بالای MIC_S است و وانکومایسین در ۵۰۰ و ۱۰۰۰ $^{\mu g}/_{ml}$ ، به طور قابل توجه دارای فعالیت بیشتری در مقابل بیوفیلم های مقاوم به متی‌سیلین و حساس به متی‌سیلین *استافیلوکوکوس آرئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بود (۲۲) .

نتیجه‌گیری:

مدل تجربی بیوفیلم، افزایش مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک ها را نشان داد: از ۱۵ برابر در مقابل نالیدیکسیک اسید تا ۱۸ برابر افزایش مقاومت در برابر سپروفلوکساسین. میانگین حداقل تراکم بازدارنده MIC (Minimum Inhibitory Concentration) این آنتی بیوتیک ها برای ۱۰ ایزوله بدست آمده به این صورت بدست آمد: برای آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین ۷/۳۷۵ µg/µl، برای افلوکساسین ۱۱/۵۳ µg/µl و برای نالیدیکسیک اسید ۲۵۹/۲ µg/µl. میانگین MIC آنتی بیوتیکهای سیپروفلوکساسین، افلوکساسین و نالیدیکسیک اسید علیه شکل بیوفیلم ۱۰ ایزوله به ترتیب برابر ۱۲۸/۴ µg/µl ، ۱۷۷/۸ µg/µl و ۳۹۴۲/۴ µg/µl بود.

همچنین شرایط بهینه تولید بیوفیلم از این باکتری در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در محیط TSB، قادر به تولید بیوفیلم بیشتری نسبت به محیط MHB بود. بعلاوه این باکتری در مدت زمان بیشتر و همچنین در انکوباتور بدون شیکر (در حالت سکون)، بیوفیلم بیشتری تولید کرد و هر چقدر که مقدار دور شیکر بالاتر بود (۱۸۰rpm نسبت به ۱۲۰rpm)، مقدار بیوفیلم کمتری به دست آمد.

فهرست مراجع:

1. Jawetz M, Adelberg E. *Medical Microbiology*. 23 rd Edition –Mc Graw Hill. 2004; 244-252
2. Yassien M, Khardori N. Interaction between biofilms formed by *Staphylococcus epidermidis* and quinolones. *Diagn Microbiol and Infect Dis*. 2001; **40**: 79-89.
3. Yasuda H. Bacterial biofilms and infectious diseases. *Trands Glycosci Glycotechnol*. 1996; **8**: 409-417
4. Thien-Fah C, Man A, O'Toole. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microb*. 2001; **9**(1): 34-39.
5. Sjolund M,Tano E, Blaser M.J , Andersson D.I , Engstrand L. Persistence of resistant *Staphylococcus epidermidis* after single course of clarithromycin. *Emerg Infect Dis.* 2005 ; **11**(9): 1389-1392
6. Vuong C, Gerke C, Somerville G.A, Fischer E.R, Otto M. Quorum – Sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis. J Infect Dis*. 2003; **188**(5): 706-718.
7. Raad I, Alrahwan A, Rotston k. *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. *Clin Infect Dis*. 1998; **26**(5): 1182-1187.
8. Zhang Y.Q, Ren S.X, Li H.L, Wang Y.X, Fu G, Yang J, *et al*. Genome –based analysis of virulence genes in a non –biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol Microbiol*. 2003; **49**(6): 1577-1593.

۹. ملک زاده ف . *مواد ضد میکروبی و مکانیسم عمل آنها* . موسسه انتشارات امید . ۱۳۸۵; ۴۹۶-۴۹۴

Archive of SID

www.SID.ir

10. Li X.Z. Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid – mediated mechanisms. *Int J Antimicrob Agents*. 2005; **25**: 435-463.
11. Dublin D. T, Fitzgibbon J.E, Nahvi M. D, John J.F. Topoisomerase sequences of coagulase – negative Staphylococcol isolates resistant to ciprofloxacin or Trorafloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; **43**(7): 1631-1637.
12. Turkmani A, Psaroulaki A, Christidou A, Samoils G, Abumourad T, Tabaa D, *et al.* Uptake of ciprofloxacin and ofloxacin by 2 Brucella strain and their floroquinolon resistant variants under condition. *Diagn Microbiol Infect Dis.*2007; **59**: 447-451.
13. Linde H. J, Sehmidt M,Fuchs E, Reischl U ,Niller H.H , Lehn N. In vitro activities of six quinolones and Mechanisms of resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase – negative Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; **5**: 1553-1557.
14. Veenstra G.J , Cremers F.F , Van Dijk H, Fleer A. Ultrastructural organization and regulation of biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis* . *J Bacteriol.* 1996; **178**(2): 537-541.
15. Timmerman C.P, Fleer A, Besnier J.M, Graaf L.D, Cremers F, Verhoef J. Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect Immun*. 1991; **59**(11): 4187-4192.
16. Hussain M, Wilcox M.H, white P.J, Faulkner M.K, spencer R.C. Importance of medium and atmosphere type to both slime production and adherence by coagulase –negative Staphylococci. *J Hosp infect*. 1992; **20**(3): 173-184.
17. Bauer A.W, Kirby W.M.M, Sherris J.C, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single Disk Method. *Am J Clin Pathol.* 1996**; 45**(4) 493-496.
18. Kronovall G. MIC determinstion of fusidic asid of ciprofloxacin using multidisk diffusion tests. *Clin Microbiol Infect Dis.* 2000; **6**: 483-489.
19. Trachoo N. Biofilm removal techaique using sands as a research tool for accessing microbial attachment on surface. *Food Science and Technology*. 2003; **26**(1): 109-115.
20. Spoering A.L, Lewis k. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol*. 2001; **183**(23): 6746 -6751.
21. Lewis k. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; **45**(4)**:** 999-1007.
22. El-Azizi M, Rao S, kanchanapoom T, khardori N. In vitro activity of vancomycin, quinupristin/dalfopristin, and linezolid against intact and disrupted biofilms of Staphylococci. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2005; **4**: 1-2.

Archive of SID

www.SID.ir