بررسی فعالیت آنتی بیوتیکهای β لاکتامی و آمینوگلیکوزیدی در برابر بیوفیلم *Pseudomonas aeruginosa* در شرایط آزمایشگاهی

احیاء عبدی عالی[۱]، مژگان محمدی مهر[۲]، یوسف آقاعلائی[۳] ، نادر مرکزی مقدم[۳]

[۱] دانشگاه الزهراء(س)،-دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

[۲] دانشگاه علوم پزشکی ارتش، دانشکده پزشکی

[۳] دانشگاه علوم پزشکی ارتش

چکیده

Pseudomonas aeruginosa، باکتری گرم منفی و پاتوژن فرصت‌طلبی است که سبب طیف گسترده‌ای از عفونتها می‌گردد. این باکتری تولید کننده بیوفیلم است. بیوفیلم جمعیتی از سلولهای رشد کننده بر یک سطح و محصور در ماتریکس اگزوپلی‌ساکاریدی است. ریشه‌کنی عفونتهای بیوفیلم با درمان مواد ضد میکروبی مشکل است. مطالعه بر روی٤٢ جدایه *Pseudomonas aeruginosa* ، بیمارستانی انجام شد و سویه موکوئید تر ۲۱٤ برای ادامه کار انتخاب شد، تولید بیوفیلم با مطالعه میکروسکوپی تاییدگردید. فعالیت باکتریسیدالی آنتی بیوتیکهای β لاکتامی و آمینوگلیکوزیدی در برابر سلولهای بیوفیلم و سلولهای پلانکتونیک بررسی شد. نتایج فعالیت باکتریسیدالی مؤید اختلاف آشکار بین سلولهای پلانکتونیک و بیوفیلم است که نشان دهنده مقاومت بیوفیلم نسبت به پلانکتونیک است. سلولهای بیوفیلم در غلظتMIC ۱۲۸جنتامی سین وMIC ٦٤ آمیکاسین در مقایسه با سلولهای پلانکتونیک ریشه کن شدند ودرغلظت µg/ml ۲٥٦۰ آنتی‌بیوتیکهای β لاکتامی، پایدار باقی ماندند.

واژه های کلیدی: بیوفیلم،*Pseudomonas aeruginos* ،آنتی بیوتیک،پلانکتونیک

مقدمه

Pseudomonas aeruginosa باکتری میله‌ای گرم منفی و یک پاتوژن فرصت طلب است. سویه‌های موکوئید این باکتری با تولید لایه گلیکوکالیکس با ویسکوزیته بالا (آلژینات) در برابر عوامل ضد میکروبی و سیستم ایمنی بدن سد دفاعی ایجاد می‌کند.

این باکتری عامل عفونتهای متنوع و گسترده‌ای بویژه در افراد مبتلا به نقص ایمنی، بیماران سرطانی، ایدزی، سیستیک فیبروزیس (CF) و سوختگیها می‌شود (۸ و ۱۰).

یکی از مشکلات درمانی این باکتری در بیماران CF مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری به درمانهای رایج آنتی‌بیوتیکی است که با تولید بیوفیلم مرتبط می‌باشد. بیوفیلم باکتری از باکتریهای محصور در ماتریکس اگزوپلی ساکاریدی (آلژینات) در اتصال به سطح ایجاد می‌گردد و سبب مقاومت آنتی‌بیوتیکی و پایداری در برابر سیستم ایمنی و فاگوسیتها می‌گردد (۸ و ١٤).

اخیراً عفونتهای ایجاد شده بوسیله دستگاههای پزشکی کاشتنی مثل سوندهای درون سیاهرگی، سوندهای ادراری وشنت‌های درون شریانی بطور قابل ملاحظه‌ای مورد توجه قرار گرفته است(۱۲). از میان این وسایل سوندهای ادراری شایع ترین عامل عفونتهای بیمارستانی هستند و علیرغم پیشرفتهای تکنولوژیکی در زمینه ساخت و طراحی آنها، باکتریوری حاصل از آن در اکثریت بیمارانی که مدت

Archive of SID
www.SID.ir

طولانی سوند دارند با مرگ و میرهمراه بوده است. زیرا وقتی باکتریوری گسترش می‌یابد، درمان آنتی‌بیوتیکی معمولاً در ریشه‌کنی بیماری شکست می‌خورد و اگر ظاهراً درمان شود، بیماری بسرعت پس از خاتمه برگشت پیدا خواهد کرد (۱۱ و ۱۳). بیوفیلمها می‌توانند ۱۰۰۰-۱۰ مرتبه پایداری بیشتری به اثرات عوامل ضد میکروبی داشته باشند (۷ و ۱۲).

مکانیسمهای مقاومت بیوفیلم به عوامل ضد میکروبی مکرر بحث شده است.Suci و همکارانش (۱۵) متذکر شدند مقاومت بیوفیلم به محدودیت انتقال عوامل ضد میکروبی از طریق بیوفیلم با ویژگیهای فیزیولوژیکی باکتریها در بیوفیلم مربوط است .

هدف از مطالعه حاضر مقایسه فعالیت باکتریسیدالی آنتی بیوتیک های β لاکتامی و آمینوگلیکوزیدی علیه سلولهای بیوفیلم و پلانکتونیک است.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه: مطالعه از نوع مطالعات پایه ای است. ٤۲ سویه *Pseudomonas aeruginosa* از بیمارستان جمع‌آوری شد. ابتدا رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز واکسیداز انجام ، وسپس با تستهای بیوشیمیایی (کشت بر روی محیطهای TSI, MRVP, Pagar, و SIM, Acetamid agar) تعیین هویت شد (۹).

آنتی بیوتیکهای مورد مطالعه: پودرهای آمیکاسین سولفات از شرکت داروپخش(شرکت دارویی Zhejiang Youngning) ، جنتامی‌سین سولفات ، سفتازیدیم از شرکت دارویی اکسیر(کارخانه دارویی Fuzhou کشور چین) ، پودر ایمی‌پنم مصرفی در این پژوهش از پودر تزریقی این آنتی‌بیوتیک، متعلق به شرکت Merck sharp & Dohme-chibert فرانسه تهیه شد.

مطالعه بیوفیلم بوسیله میکروسکوپ الکترونی نگاره

الف) تشکیل بیوفیلم روی سطح سوند: ابتدا سویه ۲۱٤ از محیط اسکیم میلک به محیط TSA+۵ درصد گلوکزمنتقل و خطی کشت داده شد و بمدت ۲۰-۱٦ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری شد. بعد از تهیه سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند از تک کلنیها, به میزان ۱ml از آن به۹ml سرم فیزیولوژی استریل افزوده پس از ورتکس لوله, ۱ml از آن به هر کدام از لوله های حاوی ۱۹ml محیط TSB ۵ درصد گلوکز افزوده شد . چند قطعه سوند ۱/۵ cm برش داده شده در شرایط استریل، نیز به آن اضافه شد.در ۲ لوله شاهد (کنترل منفی) سوسپانسیون میکروبی اضافه نشد سپس دو لوله حاوی سوند بمدت ۲٤ ساعت و چهار لوله دیگرهفت روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند .

ب) تثبیت بیوفیلم تشکیل شده بر سطح سوند: هر کدام از لوله‌های حاوی قطعات سوند با کمک ۱۰ml PBS استریل سه بار شسته و بعد هر یک از قطعات سوند بدقت و آرامی با کمک پنس استریل در ظرف حاوی ۲/۵ درصد گلوتارآلدئید در بافرفسفات ۰/۱۵ مولار با pH=۷/۳ جهت تثبیت قرارگرفت و پس از شستشو و به محلول اسیدتانیک ($\frac{W}{V}$)۱ درصد در بافر فسفات منتقل و یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. مجدداً با ۱۰ml بافرفسفات شسته شده و جهت آبگیری در ظروف حاوی رقتهای ۲۵, ۵۰، ۷۰, ۹۰ و ۱۰۰ درصد اتانول(سه بار) بمدت ۳۰-۱۵ دقیقه در دمای اتاق گرماگذاری و بعد از خشک شدن در مجاورت هوا با دقت و به کمک ژلاتین این قطعات را روی پلیت استریل چسبانده و به فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد منتقل شد. بعد از ۲٤ ساعت دردستگاه فریز درایر خشک و با طلا پوشانده (coat)شد و با میکروسکوپ الکترونی نگاره مدل LEO 440i مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی مطالعه شدند(۱).

Archive of SID
www.SID.ir

تعیین MIC آنتی بیوتیکها: در این پژوهش برای تعیین MIC آنتی‌بیوتیکهایβ لاکتامی(سفتازیدیم وایمی پنم) و آمینوگلیکوزیدی (جنتامی سین سولفات وآمیکاسین سولفات) بر سویه مورد بررسی، بروش رقت‌سازی در پلیتهای میکروتیتر، (Microdilution broth) و بر اساس پروتکل NCCLS سال ۱۹۹۷ عمل شد (۱۷).

تعیین فعالیت باکتریسیدالی آنتی بیوتیکها در برابر سلولهای بیوفیلم وپلانکتونیک: این مرحله از پژوهش با استفاده از روشهای اشاره شده در تولید بیوفیلم و با تغییراتی در روشهای مذکور انجام گرفت (۹). در ارلنهایی به حجم ۱۰۰ml, ۱۸/۸ml محیط TSB ریخته شد پس از اتوکلاو و سرد کردن محیط ,۱ml قند گلوکز ۵ درصد استریل شده با فیلتر ۰/٤۵ میکرون به ارلنها اضافه شد همچنین ۲۰۰µl از سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند و ٤ قطعه سوند ۱/۵cm استریل به ارلن ها اضافه گردید و ارلنها بمدت ٦ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد .

پس از دوره گرماگذاری ارلنهای حاوی قطعات سوند از انکوباتور خارج و ابتدا بدقت محیط کشت هر ارلن سرریز و سپس سه بار با ۱۰ml بافرفسفات سالین PBS استریل شسته شد (برای خارج شدن باکتریهای متصل نشده به قطعه سوند) محلول هر بار شستشو به ظرف استریل انتقال داده و بعنوان سلولهای پلانکتونیک (شناور) استفاده شد برای هر یک از آنتی‌بیوتیکهای مورد مطالعه ،ابتدا محلول‌های آنتی‌بیوتیکی به غلظتهای MIC (۱٦، ٤، ۱) ،در مرحله دوم غلظتهای MIC (۱۲۸، ٦٤، ۳۲) در مرحله سوم MIC (۵۱۲، ۲۵٦) و نهایتاً ۱۲۸۰ µg/ml و ۲۵٦۰ تهیه شد

در این مرحله به لوله‌های حاوی آنتی‌بیوتیکی تهیه شده مرحله قبل ،قطعات سوند(سلول بیوفیلم) یا سوسپانسیون میکروبی (سلول پلانکتونیک) را افزوده و ٦ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. به یک لوله کنترل مثبت که فقط حاوی محیط کشت ۳ml MHB بود یک قطعه سوند (بیوفیلم) و در لوله دیگر ۱ml از سوسپانسیون (سلول پلانکتونیک) اضافه شد پس از اتمام دوره گرماگذاری در مورد لوله‌های آنتی‌بیوتیکی حاوی قطعه سوند، پس از سرریز کردن محیط, قطعه سوند به لوله حاوی ۱ml بافرفسفات سالین PBS استریل منتقل و پس از ۵ دقیقه ورتکس کردن ۱ml از آن به لوله اول سریال رقت اضافه شد.در مورد لوله حاوی سلول پلانکتونیک ،1ml از آن به لوله اول سریال اضافه و CFU/ml تعیین شد(۹).

نتایج

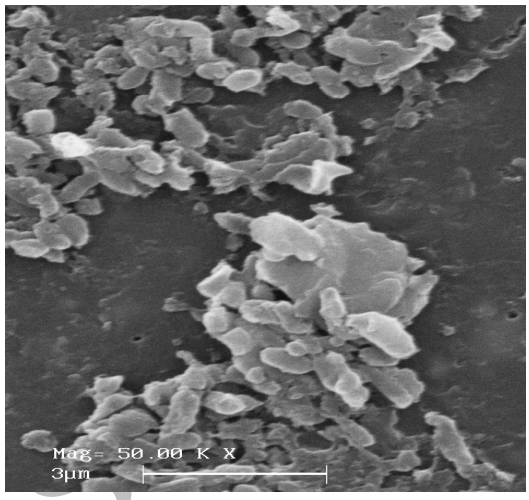
جهت سنجش توزیع باکتریهای چسبیده به سطح می‌توان از میکروسکوپ الکترونی استفاده کرد. نتایج مطالعه میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد ضخامت و ساختار بیوفیلم ۷ روزه نسبت به بیوفیلم ۱روزه بیشتر و اجتماع میکروکلنیها را بهمراه دارد (شکل ۱ و ۲). این نتایج تأیید کننده مطالعاتIshida و همکارانش می باشد (۹).

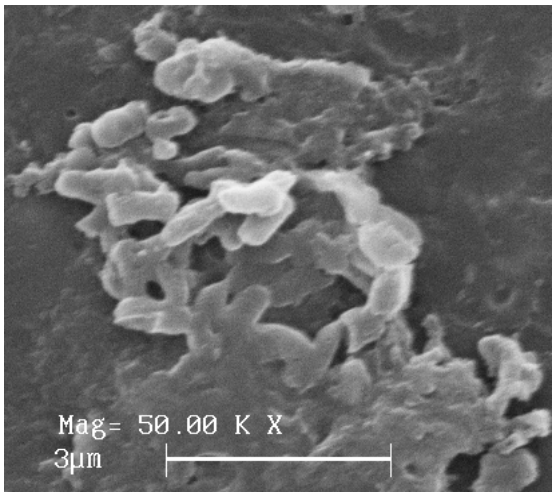
شکل ۱ : تشکیل بیوفیلم یکروزه بر سطح سوند

در مطالعه حاضر بررسی فعالیت باکتریسیدالی آنتی‌بیوتیکهای مورد مطالعه علیه سلولهای بیوفیلم و پلانکتونیک با توجه به نتایج بدست آمده اختلاف تولرانت بین سلولهای بیوفیلم و پلانکتونیک را نشان می‌دهد

Archive of SID
www.SID.ir

(جدول ۱). این نتایج با نتایج سایر محققین موافقت دارد و اختلاف آشکاری بین پایداری سلولهای بیوفیلم و پلانکتونیک در مورد آنتی‌بیوتیکهای مورد مطالعه دیده شد.





شکل ۲ تشکیل بیوفیلم هفت روزه بر سطح سوند

جدول ۱: غلظت باکتریسیدالی آنتی‌بیوتیکهای مورد مطالعه

آنتی‌بیوتیک	سلول بیوفیلم	سلول پلانکتونیک
جنتامی‌سین سولفات	۵۱۲ MIC	٤ MIC
آمیکاسین سولفات	۲۵٦ MIC	٤ MIC
ایمی پنم	> ۲۵٦۰ µ/ml	٦٤ MIC
سفتازیدیم	> ۲۵٦۰ µ/ml	۱۲۸ MIC

ایمی‌پنم: در این مطالعه پس از ٦ ساعت تیمار آنتی‌بیوتیکی در غلظت MIC کاهش کمی در تعداد سلولهای بیوفیلم و پلانکتونیک مشاهدشد در غلظت ٤MIC تعداد سلولهای پلانکتونیک از 10^6 cfu/ml به 10^4 cfu/ml و سلولهای بیوفیلم به 10^5 cfu/mlودر غلظت ١٦MIC تعداد سلولهای پلانکتونیک به 10^3 cfu/ml و تعداد سلولهای بیوفیلم به 10^4 cfu/ml کاهش یافت. در غلظت ۳۲MIC تعداد سلول‌های پلانکتونیک به 10^2 cfu/ml و تعداد سلولهای بیوفیلم کاهش کمی را در پایه 10^4 cfu/ml نشان داد. در غلظت ٦٤ MIC تعداد سلولهای پلانکتونیک کاملاً ریشه‌کن شدند و تعداد سلولهای بیوفیلم به 10^3 cfu/mlکاهش یافت درغلظت ۱۲۸ MIC کاهش کمی در تعداد سلولهای بیوفیلم نشان داده شد و در غلظت ۲۵٦ MIC تعداد سلولها به 10^2 cfu/ml کاهش یافت و این مقاومت و پایداری سلولهای بیوفیلم در غلظت ۱۲۸۰ µg/ml هم دیده شد که هنوز 10^2 cfu/ml سلولها باقی ماندند و در غلظت µg/ml

Archive of SID
www.SID.ir

۲۵٦۰ تعداد سلولها به cfu/ml ۱۰×۵۹ کاهش یافت (جدول ۲).

جدول ۲ : میانگین تعداد سلولهای بیوفیلم و پلانکتونیک در غلظتهای مورد بررسی ایمی‌پنم

غلظت آنتی بیوتیک µg/ml	تعداد سلولهای بیوفیلم CFU/ml		تعداد سلولهای پلانکتونیک CFU/ml	
	میانگین	Std.Error	میانگین	Std.Error
MIC	۳۶×۱۰^{۶}	۲/٦٤	۲٦۸/۸۸×۱۰^{٦}	۸/۵۵
٤MIC	۱۲۷/۷۷×۱۰^{۵}	۱/٤۱	۱۰۹/٦٦×۱۰٤	٤/۹۹
۱٦MIC	۱۲۹/۸۸×۱۰^{٤}	۱/٦۱	۱٤۵/۷۷×۱۰^{۳}	۷/۸۹
۳۲MIC	۳٦/۸۸×۱۰^{٤}	۱/٦۵	٤۳٦/۵۵*۱۰^{۲}	۱٦/۵۵
٦٤MIC	۲۳۸/٤٤×۱۰^{۳}	۵/۳۳	۰	۰
۱۲۸MIC	٦٦/٦٦×۱۰^{۳}	۲/۲	۰	۰
۲۵٦MIC	۱۲۹×۱۰^{۲}	۱/۱۵	۰	۰
۱۲۸۰ µg/ml	۵۸×۱۰^{۲}	٤/۱٦	۰	۰
۲۵٦۰ µg/ml	۵۸/٦٦×۱۰	۱/۸٦	۰	۰
تعداد اولیه سلول‌ها	۷۵/۵۵×۱۰^{٦}	۲/۹۲	٤٦۷/۱۱×۱۰^{٦}	۲۰/۱۵

سفتازیدیم: مشابه نتایج بدست آمده از ایمی‌پنم درغلظت MIC کاهش یک مرتبه لگاریتمی در تعداد سلول‌های بیوفیلم و پلانکتونیک مشاهدشد در غلظت ٤MIC تعداد سلولهای پلانکتونیک از CFU/ml ۱۰^{٦} به cfu/ml ۱۰^{٤} وسلولهای بیوفیلم به ۱۰^{۵}cfu/ml کاهش یافت. در غلظت ۱٦ MIC تعداد سلولهای پلانکتونیک به cfu/ml ۱۰^{۳} و تعداد سلولهای بیوفیلم به cfu/ml ۱۰^{٤} کاهش یافت. در غلظت ۳۲ MIC تعداد سلولهای پلانکتونیک و بیوفیلم کاهش در پایه cfu/ml ۱۰^{۳} نشان دادند. در غلظت ٦٤ MIC تعداد سلولهای پلانکتونیک به cfu/ml ۱۰^{۲} و تعداد سلولهای بیوفیلم به cfu/ml ۱۰^{۳} ودر غلظت ۱۲۸ MIC سلولهای پلانکتونیک کاملاً ریشه‌کن شدند و تعداد سلولهای بیوفیلم به cfu/ml ۱۰^{۲} و در غلظتهای ۲۵٦ MIC و ۵۱۲ MIC کاهش ۲ مرتبه لگاریتمی مشاهده شد. این مقاومت سلولهای بیوفیلم در غلظتهای µg/ml ۱۲۸۰ و ۲۵٦۰ µg/ml هم دیده شد سلولهای بیوفیلم در این غلظتها همچنان پایدار باقی ماندند (جدول ۳).

جنتامیسین: در غلظت MIC تعداد سلولهای پلانکتونیک از ۱۰^{٦}cfu/ml به ۱۰^{٤}cfu/ml کاهش یافت و تعداد سلولهای بیوفیلم کاهش چندانی نشان ندادند. در غلظت ٤MIC سلولهای پلانکتونیک کاملاً از بین رفتند و تعداد سلولهای بیوفیلم به cfu/ml ۱۰^{٤} کاهش یافت. در غلظت ۱٦ MIC کاهش کمی در تعداد سلولهای بیوفیلم مشاهده شد. در غلظت ۳۲ MIC تعداد سلولها به cfu/ml ۱۰^{۳} کاهش یافت و در غلظت ٦٤ MIC کاهش در پایه cfu/ml ۱۰^{۳} مشاهده شد. در غلظت ۱۲۸ MIC تعداد سلولها به cfu/ml ۱۰^{۲} کاهش یافت، در غلظت ۲۵٦MIC کاهش در پایه cfu/ml ۱۰^{۲} باقی ماند و در غلظت ۵۱۲MIC سلولهای بیوفیلم کاملاً ریشه‌کن شدند (جدول ٤).

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳ : میانگین تعداد سلولهای بیوفیلم و پلانکتونیک در غلظتهای مورد بررسی سفتازیدیم

غلظت آنتی بیوتیک µg/ml	تعداد سلولهای بیوفیلم CFU/ml		تعداد سلولهای پلانکتونیک CFU/ml	
	میانگین	Std.Error	میانگین	Std.Error
MIC	۲۳۵×۱۰^۵	۱/۷	۱۳۵/۵۵×۱۰^۵	٦/۷۸
٤MIC	۱۳۸×۱۰^۵	۱/۲۷	۵۵۹/۱۱×۱۰^٤	۸/۷٦
۱٦MIC	۳٦/۲۲×۱۰^٤	۲	۹٤٤/٤٤×۱۰^۳	۲۰/۵۹
۳۲MIC	۸۳/۷۷×۱۰^۳	۳/۳٤	۲٤٦/٦٦×۱۰^۳	۸/۱
٦٤MIC	۳٦/٦٦×۱۰^۳	۲/٤٦	۲۷۵/۵۵×۱۰^۲	۹/۹۲
۱۲۸MIC	۲۱۰×۱۰^۲	۹/۳٤	۰	۰
۲۵٦MIC	۱٦۰/٦٦×۱۰^۲	۲/۱٦	۰	۰
۵۱۲MIC	۱۱۲×۱۰^۲	٤/۲۸	۰	۰
۱۲۸۰ µg/ml	٦۰/۵۵*۱۰^۲	۲/۲۸	۰	۰
۲۵٦۰ µg/ml	۳۸/۸۸*۱۰^۲	۲/۲۹	۰	۰
تعداد اولیه سلول‌ها	۵۷×۱۰^٦	٤/۰٤×۱۰^٦	۱٦٤/٤٤×۱۰^٦	٤/۹٦×۱۰^٦

جدول ٤ : میانگین تعداد سلولهای بیوفیلم و پلانکتونیک در غلظتهای مورد بررسی جنتامی‌سین

غلظت آنتی بیوتیک µg/ml	تعداد سلولهای بیوفیلم CFU/ml		تعداد سلولهای پلانکتونیک CFU/ml	
	میانگین	Std.Error	میانگین	Std.Error
MIC	۷۷/۲۲×۱۰۵	۰/۸٤٦	٦۲۲/٦×۱۰٤	۲۱/۰۲
٤MIC	۲٦۹/۳۳×۱۰٤	۳/۱٦	۰	۰
۱٦MIC	۱٤۱/٤×۱۰٤	۱/۸۵	۰	
۳۲MIC	۲۱۱/۳×۱۰۳	۲/۵٤	۰	۰
٦٤MIC	۱٦۹/۸×۱۰۳	۱/۹۳	۰	۰
۱۲۸MIC	۱۷۲/٦×۱۰۲	۲/۲۱	۰	۰
۲۵٦MIC	۱۱۹/۳×۱۰۲	۲/۳۲	۰	۰
۵۱۲MIC	۰	۰	۰	۰
تعداد اولیه سلول‌ها	۱٦۸/٤×۱۰۵	۱٤/۸۱	۱۱۲/۷×۱۰٦	۱۱/۱

Archive of SID
www.SID.ir

آمیکاسین: در غلظت MIC تعداد سلولهای پلانکتونیک از 10^{7}cfu/ml به 10^{5}cfu/ml و تعداد سلول‌های بیوفیلم از 10^{6} cfu/ml به 10^{4} cfu/ml کاهش نشان دادند. در غلظت ٤MIC سلولهای پلانکتونیک کاملاً از بین رفتند و تعداد سلولهای بیوفیلم به 10^{4} cfu/ml کاهش یافت. در غلظت ١٦MIC تعداد سلولهای بیوفیلم به 10^{3} cfu/ml رسید. در غلظت MIC (٦٤ و ٣٢) کاهش چندانی در تعداد سلولها مشاهده نشد و در غلظت MIC ١٢٨ تعداد سلولها به 10^{2} cfu/ml کاهش یافت، در غلظت ٢٥٦MIC سلولهای بیوفیلم کاملاً از بین رفتند (جدول ٥).

جدول ٣ : میانگین تعداد سلولهای بیوفیلم و پلانکتونیک در غلظتهای مورد بررسی آمیکاسین

غلظت آنتی بیوتیک µg/ml	تعداد سلولهای بیوفیلم CFU/ml		تعداد سلولهای پلانکتونیک CFU/ml	
	میانگین	Std.Error	میانگین	Std.Error
MIC	١٧٣/٢×١٠٥	٥/٧	٥٦٨/٨×١٠٥	١٧/٣٣
٤MIC	٢٥٥/٧×١٠٤	١٧/٦	٠	٠
١٦MIC	٢٤٣/٥×١٠٣	١٢/٦	٠	
٣٢MIC	١٣٤/٤×١٠٣	١/٦	٠	٠
٦٤MIC	١٢٧/٤×١٠٣	٣/٢٧	٠	٠
١٢٨MIC	٢٠٠/١×١٠٢	١٢/٤٢	٠	٠
٢٥٦MIC	٠	٠	٠	٠
تعداد اولیه سلول‌ها	٤٠/٢٢×١٠٦	٢/٦٤	٢٤٦/٤×١٠٦	٦/٧

بحث

نقش بیوفیلمها در آلوده‌سازی ابزار پزشکی بخوبی ثابت شده است. مطالعه با میکروسکوپ الکترونی آثاری از باکتریهای ساکن برسطح ابزار پزشکی را مشخص می کند(٣). شواهدی موجود است که بیوفیلم باکتریایی سبب اندوکاردیت در بیمارانی می‌شود که در قلبشان جایگزینی دریچه مصنوعی دارند. نرخ مرگ و میر در بیماران با عفونت توسعه یافته، بیش از ٧٠ درصد است. تشکیل بیوفیلم در سطح لنزهای تماسی هم توسط *P. aeruginosa* اتفاق می‌افتد که در کراتیت نقش دارد (٣ و ٦). ایجاد بیوفیلم باکتریایی در آنها و در نهایت عفونت ناشی از بیوفیلمها که به سختی با آنتی‌بیوتیک درمان می‌گردد فاکتور اصلی محدود کننده استفاده از این وسایل است (٣).

MIC و MBC سلولها در بیوفیلم می‌تواند ١٠٠ تا ١٠٠٠ مرتبه بیشتر از سلولهای پلانکتونیک باشد. MIC و MBC معیارهای استاندارد آزمونهای حساسیت آنتی‌بیوتیکی‌اند و بعنوان مرجعی مهم در درمان عفونتهای حاد بکار گرفته می‌شود بویژه با کمک آنها اثر آنتی‌بیوتیکها در برابر ارگانیسمهای پلانکتونیک در فاز لگاریتمی سنجیده می‌شود در واقع آزمونهای رایج سنجش حساسیت برای ارزیابی در برابر بیوفیلم باکتریها مناسب نیستند زیرا عملاً از سلولهای پلانکتونیک برای تعیین میزان MIC استفاده می‌شود در

Archive of SID
www.SID.ir

حالیکه آنتی‌بیوتیک برای درمان سلولهای بیوفیلم به کار می‌رود در نتیجه درمان با شکست مواجه می‌شود (۲)

Ishida و همکارانش در سال ۱۹۹۸ (۹) گزارش کردند جنتامی‌سین, سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین در غلظت MIC پس از ٦ ساعت فعالیت کمی در برابر بیوفیلم ٦ روزه*P.aeruginosa* نشان می‌دهد و لوفلوکساسین باعث کاهش ۳ مرتبه لگاریتمی سلولهای حیاتی می‌شود. مطالعه مکانیسم مقاومت بیوفیلمها نشان داده تولید افزایش یافته β لاکتاماز در بیوفیلم *P.aeruginosa* وجود دارد.

در سال ۲۰۰۱ Amyl و همکارانش (١٤) گزارش کردند کشته شدن باکتریها بوسیله β لاکتامها وابسته به رشد سریع است و نتایج نشان داد سلولهای بیوفیلم و پلانکتونیک در فاز سکون، بدلیل رشد آهسته به β لاکتامها مقاومت نشان می‌دهند در حالیکه با مقادیر کم افلوکساسین ریشه‌کن شدند. بنابراین می توان حدس زد تحمل سلولهای بیوفیلم و سلولهای فاز سکون پلانکتونیک وابسته به حضور سلولهای پایدار است.

در این مطالعه مقاومت بالای سلولهای بیوفیلمی به آنتی‌بیوتیکهای β لاکتامی در توافق با نظر Amyl و همکارانش (١٤) و Vorachit (١٦) است که اولاً بیانگر رشد آهسته سلولهای بیوفیلم است در حالیکه آنتی‌بیوتیکهای β لاکتامی بر روی سلولهای فاز لگاریتمی و دارای رشد سریع موثرند ثانیاً تأیید کننده تولید β لاکتاماز توسط سویه ۲۱٤ است. در این مطالعه نشان داده شد سلولهای بیوفیلمی حتی در غلظت ۲٥٦۰μg/ml از آنتی‌بیوتیکهای β لاکتامی مقاوم هستند.

در مورد آنتی‌بیوتیکهای آمینوگلیکوزیدی مقاومت سلولهای بیوفیلم در مقایسه با پلانکتونیک می‌تواند بیانگر نقش آلژینات در محدودیت نفوذ این عوامل به درون سلولهای بیوفیلم باشد. نتایج مطالعات موافق با مطالعات Ishida است (۹) در غلظتهای ۲٥٦MIC آمیکاسین و ٥۱۲MIC جنتامیسین سلولهای بیوفیلم ریشه‌کن شدند در حالی که سلولهای پلانکتونیک در مورد هر دو آنتی‌بیوتیک در غلظت ٤MIC ریشه‌کن شدند.

با توجه به مشکلات ایجاد شده توسط بیوفیلم باکتریها در زمینه‌های مختلف صنعتی, غذایی و پزشکی سعی و تلاش محققین بر این است بنحوی این باکتریها را حذف یا از تشکیل آنها جلوگیری کنند. راهبردهای متعددی در زمینه کنترل بیوفیلم پیشنهاد شده است. با این حال بدلیل آثار و جنبه‌های سازگاری آن بر بیمار بسیاری از درمانها برای لوازم پزشکی کاربرد ندارد و مطالعات بیشتری را در این زمینه می‌طلبد (٥).

Davis و همکارانش (٤) پیشنهاد کردند درمانهای جدید بر اساس مولکولهای سیگنال دهنده, اسیل هموسرین لاکتون (AHL) و دخالت در سیستم سیگنال‌دهندگی QS صورت گیرد بعلاوه از آنجایی که بیوفیلمهای جوانتر یک ارگانیسم نسبت به بیوفیلمهای مسن‌تر به آنتی‌بیوتیک حساس‌ترند,ایجاد روشهای غیر تهاجمی تشخیصی که درابتدای تشکیل بیوفیلم، آن را شناسایی کند موفقیت بزرگی در درمان و ریشه‌کنی باکتری بوجود می‌آورد. در حال حاضر تعدادی از آزمایشگاهها در تلاشند ژنهایی که طی ابتدای شکل گرفتن بیوفیلم فعال یا خاموش می‌شوند را شناسایی نمایند. امید است در آینده درمانهای بازدارنده نسخه‌برداری این ژنها بتواند بیوفیلمها را کاملاً مهار نماید.

منابع

۱- محمدی مهر.مژگان،عبدی عالی احیاء.مطالعه تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزا با روش اصلاح شده پلیت میکروتیتر و میکروسکوپ الکترونی.مجله علمی

Archive of SID
www.SID.ir

وپژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش، ۱۳۸۳- ۲۹۹،(۱)،۲۹۵-۲۹۵.

2- Costerton J.W., and Lewandowski. Z.(1995). Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol,* 49, 711-745.

3. Davey M.E, and O'Toole G.A ,. (2000). Microbiol Biofilms: From Ecology to Molecular Genetics. American Society For microbiology, 847-867.

4- Davies, D.G. ,Parsek.M, Pearson. J. p. Iglewski. B. H, Costerton. J.W, Greenberg .E P. (1998). The involvement d of cell-cell signals in the evelopment of bacterial biofilm. *Science* , 280: 295-298.

5- Donlan .R.M, and Costerton. J .W. (2002). Biofilms survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews , 15(2) :167-193.

6- Finelli A.,Claude .V, Keith j,Burrows.L. (2003). Use of In-Biofilm expression Technology To Identify Genes Involved in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. J. of Bacteriology , 2700-2710.

7- Gristina A.G. (1994). Adhesive clonization of biomaterials and antibiotic resistance. Biomaterials, 8, 423-426.

8-Hodges NA, and Gordon CA. (1991). Protection of *Pseudomonas aeruginosa* against ciprofloxacin and b-lactamas by homologus alginate".*Antimicrob Agents Chemother*, 35, 2450-2452.

9- Ishida ,H.Y. Ishida ,Y. Kurosaka.T. Otani ,K. Sato and H.Kobayashi . (1998). In vitro and in vivo activities of Levofloxacin against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother , 42:1641-1645.

10-May TB, Shinabarger D., and Mahara JR. (1991). Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* :a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Rev, 4: 191-206.

11- Nickel .J.C , .Costerton .J.W, Melean J.C. , and Olson. M. (1994)."Bacterial biofilms influence on the pathogenesis ,diagnosis and treatment of urinary tract infection. J. Antimicrob. Chemother, 33:suppl.A, 31-41.

12- Nickel .J.C,Ruseska.j,Wright.B,Costerton.J W. (1985).Tobramycine resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary tract catheter. Antimicrob Agents Chemother, 27: 619-624

13- Nickel .J.C , Gristina .A .G., and Costerton. J.w, (1985). Electeron microscopic study of an infected foley catheter. The Can.J.Surgery, 28: 50-51.

14-Spoering A.L., and Lewis .K. (2001). Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by Antimicrobials. J. of Bacteriology , 183 (23): 6746-6757.

15.Sticker. D. (1999). Biofilm. Current option in microbiology, 2: 270-275.

16-Vorachit M ., and Costerton J .W., (1993). Resistance of *Pseudomonas Psudomallei* growing as a biofilm on silastic discs to ceftazidim and co-Trimoxazole. Antimicrob A gents chemother, 37: 2000-2002.

17. Woods.G.L, and Washington A., (1995). Antimicrobial susceptibility test dilution and disk diffusion methods. In Murray.PR(ed)Mannual of clinical microbiology 6th ed.ASM press P.1327-41.

Archive of SID

www.SID.ir

In Vitro Study of bactericidal activity of β-lactam and aminoglycoside antibiotics against biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*

Abdi A.A.[1], Mohammadimehr M.[2], Agha Alaei Y.[2], Markazimoghadam N.[2]

[1]**Biology Dept. , Faculty of Science , Alzahra University,Tehran , Iran.**

[2]**Army University of Medical Science**

Abstract:

Pseudomonas aeruginosa is gram negative and opportunistic bacteria, causing a wide variety of infections.This bacteria produces biofilm. A biofilm is a population of cells growing on a surface and enclosed in an exopolysaccharide matrix. Biofilm infections are difficult to eradicate with antimicrobial treatment. In this study 42 clinical isolates of *P. aeruginosa* were collected from hospital. *P. aeruginosa* strain 214 producing higher biofilm was selected for further study. We investigated biofilm production with scanning electeron microscope and the bactericidal activity of β-lactam and aminoglycoside against biofilm and planktonic cells. The result showed high difference in antibiotic susceptibility between planktonic and biofilm populations.Biofilm cells were complety eradication by treatment with 128 MIC gentamicin and 64MIC amikacin,whereas the biofilm still remained during treatment at a concetration 2560µg/ml of β-lactam (Imipenem and ceftazidim).

Key words:Biofilm,*Pseudomonas aeruginosa*,antibiotic,planktonic

Archive of SID

www.SID.ir