فصلنامه

دانش میکروب شناسی

سال اول، شماره ۲، بهار ۱۳۸۸

تاثیر مواد ضد میکروبی بر بیوفیلم سویه های مقاوم انتروکوکی جداشده از کاتترهای ادراری

میترا صالحی[1*] فرزانه حسینی[1]، آیدا وحیدی[2] و مهدی تندر[3]

۱- استادیارگروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال (نویسنده مسئول) ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال ۳- دانشجوی کارشناسی گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

چکیده

انتروکوک ها بخشی از میکرو فلور روده را تشکیل می دهند که توانایی اتصال به سطوح مختلف را داشته و آنها را قادر به تولید بیوفیلم بر روی وسایل بیمارستانی نموده است. این باکتری ها در کاتترهای ادراری که به مدت طولانی در بدن بیمار قرار می گیرند، بیوفیلم تولید می کنند که منجر به بروز عفونت های مزمن می شود. ایجاد مقاومت بالا نسبت به آنتی بیوتیک ها درمان این بیماران را با مشکل جدی مواجه می سازد.

در این بررسی انتروکوک های جدا شده از کاتتر های بیماران بستری شده بعد از شناسایی و تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جهت تشکیل مدل بیوفیلم مورد استفاده قرار گرفتند. بیوفیلم ها در میکروپلیت هایی از جنس پلی استیرن تشکیل شدند. سپس میزان تاثیر مواد ضد میکروبی متداول بر روی میزان تشکیل بیوفیلم با روش میکرو تیتر پلیت توسط دستگاه الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت. در بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های انتروکوکی، بیشترین و کمترین مقاومت به ترتیب نسبت به تتراسایکلین (۹۳/۷٪)، آمپی سیلین(۲۱/۸٪) و بیشترین مقاومت چند دارویی در گروه تتراسایکلین شامل وانکومایسین و تتراسایکلین (۷۸/۱ ٪) مشاهده شد. در بین بیو ساید ها ی مورد استفاده بیشترین در صد میزان کارآیی نسبت به حذف و کشتن سلول های شرکت کننده در بیوفیلم به ترتیب در بنزآلکانیم کلراید، کلر، پر اکسید هیدروژن و پایوویدن آیوداین مشاهده شد. تاثیر بنزآلکانیم کلراید و کلر بر بیوفیلم انتروکوک نشان داد که درکمترین غلظت (۲۵۰پی پی ام) موجب کشته شدن تقریبا ۱۰۰٪ باکتری ها می شوند.

واژگان کلیدی: انتروکوک، بیوفیلم، کاتتر ادراری، مواد ضد میکروبی

مقدمه

انتروکوک ها به عنوان میکرو فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان و حیوانات محسوب می شوند. برخی از گونه های آن از عوامل عفونت های سیستم ادراری، عفونت های شکمی و لگنی، سپتی سمی، زخم، اندوکاردیت و عفونت های وابسته به کاتتر می باشند (۱و۲). در سال های اخیر افزایش عفونت انتروکوکی در سطح جهان مشاهده می شود به طوری که در برخی از گزارشات انتروکوک ها را دومین عامل شایع عفونت های دستگاه ادراری و هم چنین سومین علت شایع عفونت های بیمارستانی معرفی می کنند (۳، ۴و۵). در این جنس گونه های زیادی شناسایی شده اند (۶). دو گونه ی انتروکوک فکالیس (*E.faecalis*) و انتروکوک فاسیوم (*E.faecium*) در عفونت‌های مهم انسانی گزارش شده‌اند

Archive of SID

www.SID.ir

که به ترتیب حدود ۸۵ تا ۹۵ درصد و ۵الی۱۰ درصد از کل عفونت های انتروکوکی را شامل می شوند (۷، ۸). انتروکوک فکالیس پاتوژن گرم مثبت و فرصت طلبی است که در محیط های بیمارستانی، علاوه بر انتقال در بین بیماران تمایل زیادی جهت اتصال بر سطوح وسایل و ابزارپزشکی مانند کاتترهای واقع در دستگاه ادراری و تشکیل بیو فیلم را دارد (۹). بیوفیلم جمعیتی از سلول‌های باکتری هستند که در ابتدا با نیروی واندروالسی، به طور سست به سطوح بی جان یا بافت زنده متصل می شوند و سپس با تولید پلی مرهای خارج سلولی و ایجاد ساختار ماتریکس اگزو پلی ساکاریدی (آلژینات)، موجب اتصال برگشت ناپذیر سلول ها به سطوح می شوند (۱۰، ۱۱). توسعه بیوفیلم باعث مقاومت باکتری نسبت به درمان های آنتی بیوتیکی شده (۱۱و۱۲) و می تواند منجر به بروز مشکلات حاد در این زمینه شود. باکتری های شرکت کننده در بیوفیلم رفتاری متفاوت نسبت به سلول های آزاد (پلانکتونیک) دارند (۱۳و ۱۴) به طوریکه آن ها ۱۰۰-۱۰ مرتبه مقاومت بیشتری نسبت به عوامل ضد میکروبی از خود نشان می دهند (۱۵).

دخالت بسیاری از عوامل محیطی ازجمله ترکیبات غذایی، غلظت داروهای ضد میکروبی، دما و فاکتورهای ژنتیکی در تولید و گسترش بیوفیلم ثابت شده است (۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸). در محیط های بیمارستانی بیوفیلم میکروبی روی سطوح مختلف به عنوان یک مخزن انتقال عفونت مطرح می شوند و مسئول ایجاد ۶۵٪ عفونت های بیمارستانی هستند (۱۹، ۲۰، ۲۱). استفاده از کاتترهای ادراری از جنس لاتکس یا سیلیکون که به مدت طولانی دربدن بیماران قرار می گیرد ، منجر به تشکیل بیوفیلم باکتریایی و گسترش باکتریوری می شود (۵، ۲۲). این وسایل از مهم ترین منابع عفونت های بیمارستانی به شمارمی آیند.

استافیلوکوک ها، سودوموناس ها و انتروکوک ها به عنوان باکتری های شاخص در عفو نت های مجاری ادراری با مقاومت بالای آنتی بیوتیکی و توانایی تولید بیوفیلم گزارش شده اند (۹، ۲۳، ۲۴). مواد ضد میکروبی (بیوساید) که قادر به جلوگیری از رشد میکرو ارگانسیم ها می باشند، با نفوذ به درون بیو فیلم ها، می توانند باعث مرگ باکتری های شرکت کننده در بیوفیلم و هم چنین کاهش ضخامت آن شوند (۲۵). بیوساید هایی که به عنوان مواد ضد عفونی کننده کار برد دارند، دارای قدرت و تاثیر متفاوت بر میکرو ارگانسیم ها می باشند و به گروه های مختلف تقسیم می شوند (۲۶، ۲۷).

بیوساید های مورد بررسی در این تحقیق شامل پراکسید هیدروژن ازعوامل اکسید کننده، کلرین به عنوان ترکیبات کلر دار، بنزآلکانیم کلراید از گروه ترکیبات چهارگانه آمونیوم و در نهایت از پایوویدن آیوداین ازگروه یدوفرم بودند که معمولا در محیط های مختلف جهت ضد عفونی کردن سطوح متفاوت کار برد دارند. با توجه به نقش مهم بیو فیلم انترو کوکی در سطوحی مانند کاتترهای ادراری، انتقال آسان و مقاومت دارویی آنها در عفونت های ادراری، به نظر می رسد بررسی نحوه ی تاثیر مواد ضد عفونی کننده در بیوفیلم کاتترهای ادراری در پیشگیری از عوارض جانبی کاربرد کاتترها حائز اهمیت باشد.

مواد وروش ها

در این بررسی تعداد ۱۰۰ کاتتر ادراری در طی یک سال از بیماران مراجعه کننده به مراکز بهداشتی درمانی سطح تهران جمع آوری شد. نمونه های جمع آوری شده در محیط نگهدارنده تایوگلیکولات (شرکت مرک) قرار گرفته و بلافاصله به آزمایشگاه انتقال داده شدند. جداسازی باکتری ها ی شرکت کننده در بیو فیلم کاتتر ادراری به روش Cerca انجام گرفت (۲۸). برای این منظور هر کاتتر بعد از برش، حداقل سه مرتبه با سرم فیزیولوژی سترون کاملا شستشو داده شد تا سلول های پلانکتونی آن حذف شود. سپس با اسکالپل استریل، سطح داخلی کاتتر خراش داده و توسط یک پنس استریل، در درون لوله حاوی آب مقطر سترون به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ورتکس (جهت کنده شدن باکتری ها از سطح کاتتر) قرار گرفت. سپس آب مقطر با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید و یک لوپ از رسوب حاصل در محیط بایل اسکولین آگار کشت و در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد گرما گذاری شد. پس از ۲۴ ساعت تشکیل کلنی های سیاه رنگ بر روی محیط کشت نشان دهنده هیدرولیز اسکولین بود. جهت تهیه کشت خالص از کلنی های رشد یافته بر روی محیط بایل اسکولین آگار کشت مجدد انجام

Archive of SID

www.SID.ir

گرفت. برای اطمینان از حضور باکتری انترو کوک، کلنی های کشت خالص مورد بررسی میکروسکوپی و بیوشیمیایی قرار گرفتند. برای این منظور از آزمون های رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، هیدرولیز هیپورات، تحمل نمک ۶/۵٪، احیای تلوریت، هیدرولیز اسید آمینه آرژینین و تخمیر قند ها استفاده شد ودر نهایت تعیین گونه شدند (۶، ۲۹).

دیسک های آنتی بیوتیک برای تعیین حساسیت سویه های جدا شده (شرکت پادتن طب) شامل وانکومایسین(۳۰میکروگرم)، جنتامیسین (۱۰ میکروگرم)، استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، تتراساکلین (۳۰ میکروگرم)، کانامایسین (۳۰ میکروگرم)، ریفامپین (۵ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۰ میکروگرم)، آمپی سیلین (۲۵ میکروگرم) و سفالکسین (۳۰ میکروگرم) بودند. بررسی مقاومت دارویی (آنتی بیوگرام) به روش دیسک گذاری Kirby-Bauer انجام پذیرفت (۳۰). برای این منظور سوسپانسیون میکروبی برابر با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند (10^8 CFU/ml)، از یک لوپ کلنی باکتری های ۱۶ ساعته (فاز رشد) تهیه گردید.

سپس توسط سوآب سترون از سوسپانسیون میکروبی برداشته و بر روی محیط مولر هینتون آگار خون دار به صورت متراکم کشت داده شد و در شرایط سترون، دیسک گذاری انجام پذیرفت. میزان قطر هاله عدم رشد بعد از ۲۴ ساعت گرما گذاری در دمای ۳۷ درجه با کولیس اندازه گیری شد. بعد از تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، ده سویه انترو کوک فکالیس دارای مقاومت چند گانه جهت تولید بیوفیلم و بررسی تاثیر مواد ضد میکروبی انتخاب شدند. جهت تهیه بیو فیلم و بررسی اثرات مواد ضد میکروبی در میکرو پلیت، ابتدا سوسپانسیون باکتریایی از سویه های جدا شده ی بالینی و استاندارد انتروکوک فکالیس ATCC 1393 (سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران) تهیه گردید.

برای این منظور ۲ میلی لیتر از کشت میکروبی۲۰ ساعته، به ۱۸ میلی لیتر محیط مایع BHI افزوده و مخلوط شد. از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده با کدورت ۰/۵ مک فارلند، میزان ۲۰۰ میکرولیتر در چاهک های میکرو پلیت ها پلی استیرنی تلقیح شد. در این میکرو پلیت ها که دارای ۸ ردیف و۱۲ ستون بودند یک ستون از چاهک ها (به عنوان شاهد) فقط حاوی محیط کشت مایع و ستون دیگر (به عنوان کنترل) حاوی محیط کشت و باکتری بودند. در نهایت هر ردیف برای یک سویه جدا شده جهت تشکیل بیو فیلم باکتریایی در نظر گرفته شد. بعد از تلقیح، سطح میکرو پلیت ها پوشانده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرما گذاری شدند. بعد از اتمام مدت گرماگذاری، محتوای چاهک ها کاملا تخلیه شد. هر چاهک میکروپلیت سه مرتبه با سرم فیزیولوژی شستشو و تکان داده شد تا هرگونه فرم شناور باکتری که در بیوفیلم شرکت نکرده بود، حذف شود. در چاهک های شاهد و کنترل، بیوفیلم های تشکیل شده با ۲۰۰ میکرولیتر فرمالید ۱۲٪ به مدت یک ساعت تثبیت شدند. در چاهک های باقی مانده، از مواد ضد میکروبی (پراکسید هیدروژن، کلر و بنزآلکانیم کلراید با غلظت های ۲۵۰ppm، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و و پایوویدن آیوداین با غلظت ۱۰٪) به میزان ۲۰۰ میکرولیتر با غلظت های مختلف به مدت یک ساعت بر روی بیو فیلم ها تاثیر داده شدند. در این مدت تقریبا هر ۲۰ دقیقه یک بار، محتوای چاهک ها تخلیه و ماده تازه جایگزین آن می شد. تمام چاهک ها پس از شستشو، به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شدند (۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله و یا تترازولیوم کلراید). سپس رنگ اضافه با شستشوی مکرر از داخل چاهک ها تخلیه شد. جذب نوری چاهک های میکرو پلیت با دستگاه الیزا قرائت شد (۳۱).

در سنجش تاثیر مواد ضد میکروبی بر حذف بیو فیلم از رنگ کریستال ویوله و برای محاسبه توانایی مواد ضد میکروبی در نفوذ به داخل بیو فیلم و کشتن سلول های شرکت کننده در بیوفیلم، از رنگ تنفسی ۲، ۳ و۵- تری فنیل تترازولیوم کلراید یا TTC استفاده شد. جذب نوری میکرو پلیت رنگ شده با کریستال ویوله ۲٪ در طول موج ۴۹۰nm و رنگ تری فنیل تترازولیوم کلراید ۰/۰۲٪ در طول موج۴۵۰nm قرائت شد (۳۱، ۳۲). ارزیابی تاثیر عوامل ضد میکروبی در کاهش ضخامت بیو فیلم و میزان مرگ باکتری های بیو فیلم از طریق محاسبه ی جذب نوری بیوفیلم نمونه های تیمار شده با مواد ضد میکروبی نسبت به نمونه کنترل و شاهد طبق فرمول زیر، انجام

Archive of SID

www.SID.ir

پذیرفت (۳۱، ۳۲، ۳۳، ۳۴).

(C-B) - (T-B) / (C-B) × 100 = درصد تاثیر ماده ضد عفو نی کننده بر بیوفیلم

C میانگین جذب نوری چاهک های کنترل (محیط کشت + باکتری)

B میانگین جذب نوری چاهک های شاهد (محیط کشت)

T میانگین جذب نوری چاهک های تیمارشده (محیط کشت + باکتری + مواد ضد عفو نی کننده)

اختلاف آماری بین میانگین های بدست آمده با استفاده از نرم افزار Excel مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج و بحث

در مجموع از کشت ۱۰۰ کاتتر ادراری ۴۶ سویه متعلق به جنس انتروکوکوس جدا و شناسایی شدند. از بین ۴۶ سویه، ۳۸ سویه (۸۲/۶٪) متعلق به گونه فکالیس و ۸ سویه (۱۷/۳٪) متعلق به گونه فاسیوم بودند. میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های رایج درمان به ترتیب شامل تتراسایکلین (TE)، ونکومایسین (V)، استرپتومایسین (S)، سیپروفلوکسین (CP)، ریفامپین (RE)، جنتا مایسین (GM)، اریترومایسین (E)، کلرامفنیکل (C) و آمپی سیلین (AM) بوده است (جدول۱). در آزمون تعیین حساسیت میکروبی، بیشترین میزان مقاومت چند گانه نسبت به آنتی بیوتیک های وانکومایسین و تتراسایکلین ۷۸/۱٪، نسبت به سیپروفلوکسین و تتراسایکلین ۷۵٪، نسبت به ونکومایسین و سیپروفلوکسین ۵۹/۳٪ و نسبت به ونکومایسین و استرپتومایسین ۵۳/۱٪ برآورد شدند (جدول۲) . سویه های بیمارستانی در مقایسه با سویه ی استاندارد نسبت به آنتی بیوتیک های تتراسایکلین و استرپتومایسین مقاوم تر بودند. استفاده از مواد ضد عفونی کننده در محیط های بیمارستانی علاوه بر کاهش تعداد میکروارگانیسم ها، می تواند انتقال سویه های مقاوم میکروبی را در بیمارستان ها به حداقل برساند (۳۵). از طرفی گزارشاتی مبنی بر تاثیر استفاده از مواد ضد عفونی کننده در ایجاد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها دیده می شود (۲۰، ۳۶).

جدول ا. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های انترو کوک جدا شده از کاتتر های ادراری (برحسب در صد)

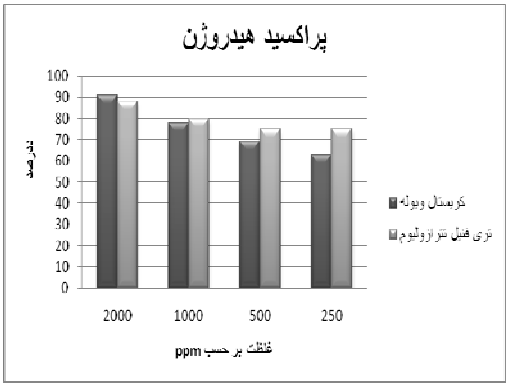
مقاومت به حداقل یک آنتی بیوتیک												مقاومت چند گانه			
تتراسایکلین (TE)	استرپتومایسین (S)	ونکومایسین (V)	سیپروفلوکسین(CP)	جنتا مایسین (GM)	اریترومایسین (E)	کلرامفنیکل	ریفامپین	آمپی سیلین (AM)	V+TE	TE+CP	V+CP	V+S
۹۳/۷	۶۵/۶	۸۱/۷	۷۸	۶۸/۷	۶۶/۶	۲۵	۶۹/۵	۲۱/۸	۷۸/۱	۷۵	۵۹/۳	۵۳/۱

تتراسایکلین(TE)، ونکومایسین(V)، استرپتومایسین(S)، سیپروفلوکسین(CP)، ریفامپین(RE)، جنتا مایسین(GM)، اریترومایسین(E)، کلرامفنیکل(C)، آمپی سیلین(AM)

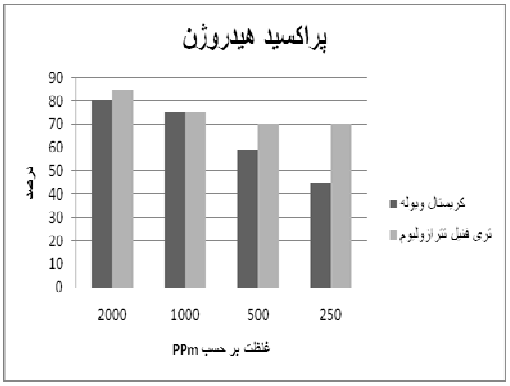
محققانی تشکیل بیو فیلم انتروکوکی بر روی وسایل پزشکی بکار رفته در بدن انسان را گزارش داده اند (۵). از این رو بنظر میرسد پیشگیری از گسترش بیوفیلم سویه های انتروکوک فکالیس با مقاومت چند گانه و کنترل بیشتر عفونت های بیمارستانی از اهمیت ویژه ای بر خوردار باشد. منطقی ترین راه مقابله با این منابع عفونت، استفاده از مواد ضد عفونی کننده ی شیمیایی است که توانایی کاهش ضخامت لایه بیوفیلم و کشتن میکروارگانیسم ها ی شرکت کننده در بیوفیلم را دارند.

Archive of SID

www.SID.ir



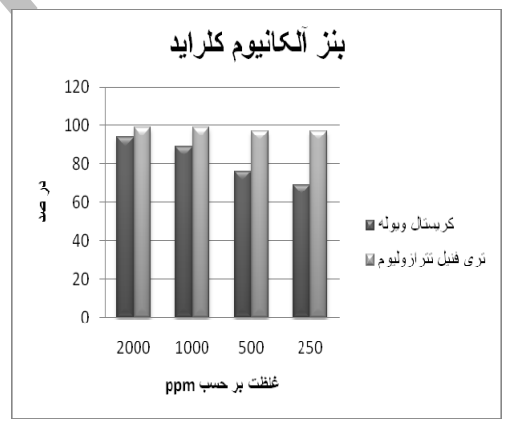
الف



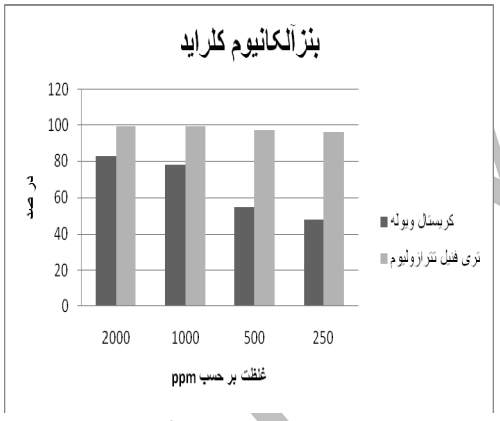
ب

نمودار ۱. تاثیر پر اکسید هیدروژن بر بیو فیلم انتروکوک در شرایط آزمایشگاهی الف) سویه ی استاندارد ب) سویه های جدا شده از کاتتر های ادراری

بررسی تاثیر پر اکسید هیدروژن درحذف و کشتن سلول های بیو فیلم نشان داد که میانگین جذب نوری چاهک های تیمار شده با پر اکسید هیدروژن در رنگ آمیزی کریستال ویوله در غلظت های ppm ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ به ترتیب موجب حذف ۴۵٪، ۵۹٪، ۷۵٪ و ۸۰٪ از بیو فیلم شده است (نمودار۱). میزان تاثیر پر اکسید هیدروژن در مرگ باکتری های بیو فیلم با رنگ تری فنیل تترازولیوم بیانگر این مطلب بود که در بیشترین غلظت ۸۷٪ و در کمترین غلظت ۷۰٪ از سلول های باکتری کشته شده اند.



الف



ب

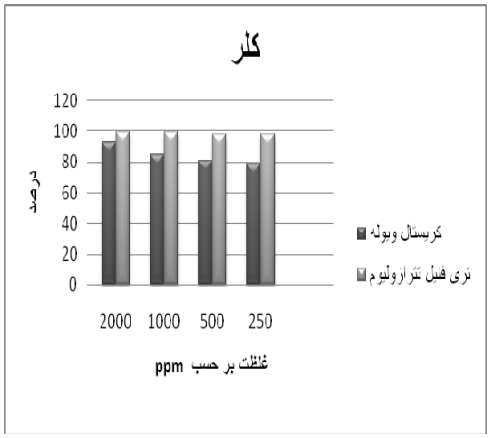
نمودار ۲. تاثیر بنزآلکانیم کلراید در حذف و کشتن باکتری های انترو کوک شرکت کننده در بیو فیلم الف) باکتری استاندارد ب) سویه های جدا شده از کاتتر های ادراری

پراکسید هیدروژن بر بیو فیلم سویه استاندارد در مقادیر ppm ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ به ترتیب ۶۳٪، ۶۹٪، ۷۸٪ و ۹۱٪ دارای اثر حذف بوده و در این غلظت ها به ترتیب مرگ ۷۵٪، ۷۵٪، ۸۰٪ و ۸۸٪ از سلول های شرکت کننده مشاهده شد.

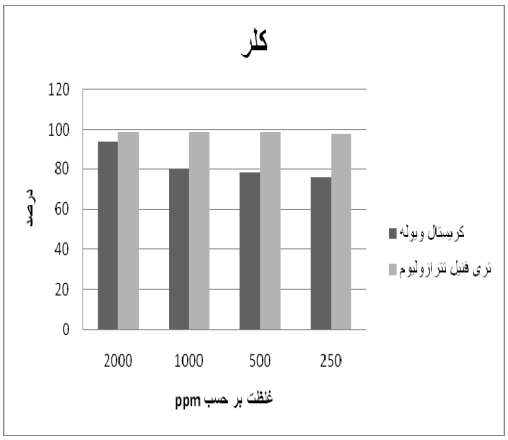
بررسی تاثیر ماده بنزآلکانیم کلراید از گروه ترکیبات چهار گانه آمونیوم نشان داد که این ماده در مقایر ppm ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ به تر تیب باعث حذف ۸۳٪، ۷۸ ٪، ۵۵ ٪ و ۴۸٪ از بیوفیلم شده است. همچنین در کمترین غلظت خود ۹۶ ٪ و در غلظت ها ی بالا ۹۹٪ از سلول های انتروکوک بیو فیلم را از بین برده است. این ماده در بالاترین غلظت (۲۰۰۰ پی پی ام) ۹۴٪ و در پایین ترین غلظت (۲۵۰ ppm) ۶۹٪ از سویه استاندارد بیو فیلم را حذف کرده و در تمامی مقادیر موجب مرگ۹۹٪ بیوفیلم باکتریایی شده است (نمودار۲).

Archive of SID

www.SID.ir



الف

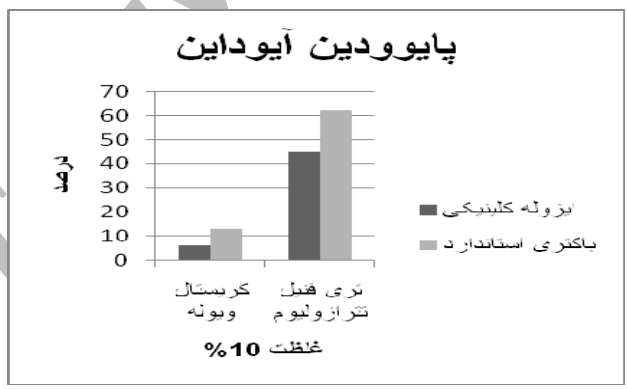


ب

نمودار ۳. میانگین جذب نوری چاهک های تیمار شده با کلر الف) باکتری استاندارد ب) سویه های جدا شده از کاتتر های ادراری

بررسی میزان جذب چاهک های بیو فیلم با کتریا یی تیمار شده با کلر ین نشان می دهد که این ترکیب در غلظت های ppm ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ به تر تیب ۹۴ ٪، ۸۰ ٪، ۷۸ ٪ و ۷۶ ٪ از بیوفیلم را حذف کرده و در تمامی مقادیر باعث مرگ ۹۹ در صدی باکتری های بیوفیلم شده است. این ماده ۸۰٪ الی ۹۰٪ از بیو فیلم انتروکوک سویه استاندارد را حذف و ۹۹ در صد سلول ها را از بین برد (نمودار۳).

محاسبه جذب نوری چاهک های حاوی بیو فیلم تیمار شده با پایوویدن آیوداین (غلظت ۱۰٪) رنگ آمیزی شده با کریستال ویوله نشان داد که ۶ ٪ از بیو فیلم سویه های بالینی کنده و حذف شده اند. جذب نوری چاهک ها ی رنگ شده با تترا زولیوم مرگ ۴۵ در صدی انتروکوک های تشکیل دهنده بیو فیلم را نشان داد. پایوویدن آیوداین ۱۳٪ از بیو فیلم باکتری استاندارد را حـذف و با عث مـرگ ۶۲ در صد سـلول هـای آن گردید (نمودار۴).



نمودار ۴. تاثیر غلظت ۱۰٪ پایوویدن آیوداین درحذف و کشتن سلو ل های بیو فیلم در شرایط آزمایشگاهی

نتایج حاصل از این تحقیق مبنی بر جداسازی و شناسایی قابل توجه انتروکوک در کاتتر های ادراری، بیانگر این مطلب است که این باکتری می تواند یکی از شایع ترین میکروارگانیسم ها ی تشکیل دهنده ی بیو فیلم میکروبی بر روی این گونه سطوح در بیماران باشد. این مطالعه نشان داد که بیش از۸۰٪ سویه های انترو کوکی جدا شده را گونه ی انترو کوکوس فکالیس تشکیل می دهد. در بیشتر مطالعات انجام گرفته در سایر نقاط جهان نیز همواره انتروکوک فکالیس بالاترین شیوع را در عفونت های بالینی به خصوص در سیستم ادراری داشته است (۲، ۳۸).

Archive of SID

www.SID.ir

استوارت در سال ۲۰۰۳ در گزارش خود بیان می کند که در صورت حذف ناقص بیوفیلم توسط عوامل ضد میکروبی، سلولهای شرکت کننده در بیوفیلم زنده مانده و در نهایت با رشد مجدد، بیوفیلم رابه حالت اولیه خود برمی گردانند (۳۱).

انتروکوک ها تا کنون مقاومت به آنتی بیوتیک های متعدد را نشان داده اند. در این مطالعه بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک به ترتیب در گروه تتراسایکلین شامل تتراسایکلین (۹۳/۷٪)، ونکومایسین (۸۱/۷٪) ودر گروه کوئینون ها مربوط به سیپروفلوکساین(۸۷٪) و در گروه آمینو گلیکوزیدها مربوط به جنتامایسین (۶۸/۷ ٪) مشاهده می شود. در بررسی آل یایسن و همکاران بر روی ۱۲۶ نمونه کلینیکی مختلف از جمله ادرار، خون،...و۴ عدد کاتتر که در سال های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۵ از بیمارستان بقیه ا... تهران جمع آوری شده بود، بیشترین مقاومت به ترتیب شامل وانکومایسین (۱۰۰٪)، تتراسایکلین (۵۸٪)، سیپروفلوکساین و جنتامایسین (۴۱/۶٪) گزارش شده است. محققان یکی از دلایل عمده افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی را قابلیت انتقال از طریق کانجوکیشن بیان می کنند از طرفی شرایط بیوفیلم باکتری ها می تواند در این امر دخیل باشد (۳۹، ۴۰). در تحقیق حاضر نیز افزایش میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های انترو کوک را می توان به نوع نمونه (کاتترهای ادراری حاوی بیو فیلم)، مصرف بی رویه دارو و همچنین به گذشت زمان و احتمال انتقال فاکتورهای مقاومت بین باکتری ها به خصوص سلول های شرکت کننده در بیو فیلم نسبت داد.

بررسی تاثیر پر اکسید هیدروژن بر بیو فیلم سویه های جدا شده بالینی نشان داد که افزایش غلظت با افزایش میزان حذف و مرگ سلو ل های مولد بیو فیلم رابطه دارد. به طوری که با تغییر غلظت از۲۵۰ به ۲۰۰۰ پی پی ام در صد حذف از ۴۵٪ به ۸۰٪ و قدرت کشندگی از۷۰٪ به ۸۷٪ افزایش یافته است. تاثیر این بیوساید بر بیوفیلم نمونه های بالینی نسبت به سویه استاندارد کمتر بوده است. پر اکسید هیدروژن در مقادیر ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی پی ام دارای بهترین اثربر بیو فیلم انترو کوک های بالینی و سویه استاندارد می باشد. در همه موارد کمترین غلظت بیش از۷۰٪ و بیشترین غلظت بیش از ۸۰٪، منجر به مرگ سلول های مولد بیو فیلم گردید. پرسترل و همکاران در سال ۲۰۰۷ تاثیر پر اکسید هیدروژن را بر بیو فیلم باکتری گرم مثبت استافیلوکوک اپیدرما یدیس ایزوله شده از کاتتر های عروقی، در روش میکرو تیتر بررسی کردند. نتایج پژوهش آنها نشان داد که با افزایش غلظت بیو ساید میزان حذف بیوفیلم نیز بیشتر می شود. اما با افزایش غلظت از ۳ به ۵٪ تفاوت محسوسی در عملکرد پر اکسید هیدروژن مشاهده نمی شود (۳۳). در مطالعه حاضر نیز میزان کشندگی این بیو ساید در غلظت های ۱۰۰۰ و۲۰۰۰ پی پی ام تقریبا یکسان بوده است .

بررسی تاثیر کلر درحذف و کشتن بیوفیلم انترو کوکی نشان داد که کلر در بالاترین غلظت مورد بررسی، ۹۴٪ از بیو فیلم ایزوله های بالینی را حذف و ۹۹٪ از سلول های مولد آن را از بین برده است. در غلظت های پایین تر نیز از ۷۵ تا ۸۰٪ موجب حذف بیو فیلم شده است. مقایسه نتایج کلر در حذف بیو فیلم سویه های جدا شده از کاتترهای ادراری وسویه استاندارد بیانگر این مطالب است که باکتری استاندارد از حساسیت بیشتری نسبت به سویه های بالینی برخوردار است. نکته قابل توجه اینکه کلر در تمام غلظت ها قابلیت کشتن تقریبا صد در صد ی سلول های شرکت کننده در بیو فیلم را دارد. بنابر این می توان در مراکز درمانی مانند بیمارستان ها و هم چنین محیط های عمومی نظیر استخر ها ازکمترین غلظت کلر جهت ضد عفونی کردن سطوح های استفاده کرد تا با گذشت زمان و مصرف مکرر آن، موجب کسب مقاومت باکتری نسبت به بیوساید نشود.

افزایش غلظت بنزآلکانیوم کلراید در میزان حذف بیوفیلم انتروکوکی موثر بوده است. در مقایسه نتایج انترو کوک های جدا شده از کاتترهای ادراری و سویه استاندارد، تفاوت اندکی در مقدار اثر این ماده بر حذف بیو فیلم باکتری استاندارد نسبت به نمونه های بالینی مشاهده شده است. به طوری که با افزایش غلظت از ۲۵۰ به ۲۰۰۰ پی پی ام میزان حذف بیو فیلم سویه های بالینی از ۴۸٪ به ۸۳٪ می رسد. این بررسی نشان داد که تمام مقادیر بنزآلکانیوم کلراید سلول های انترو کوک شرکت کننده در بیوفیلم را تحت تاثیر قرار داده و با کارایی قابل توجهی تقریبا ۱۰۰٪ آن ها را از بین می برد. کارن اسمیت در سال ۲۰۰۸ اثر بیوساید بنزآلکانیوم کلراید را بر باکتری های جداشده از عفونت های بیمارستانی دارای

Archive of SID

www.SID.ir

مقاومت چند گانه را در شرایط بیوفیلم مورد مطالعه قرار داد. در گزارش این محقق بیان می شود که این غلظت قادر به کشتن ۱۰۰ در صدی باکتری های بیو فیلم نمی باشد زیرا ۸ الی ۱۱٪ از باکتری ها قابلیت زیست دارند. بنابر این سلول های زنده توانایی تکثیر مجدد و انتشار در محیط را خواهند داشت.

در تحقیق حاضر می توان اذعان داشت که غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام بنزآلکانیوم کلراید قادر به از بین بردن انتروکوک های شرکت کننده در بیو فیلم است و احتمال انتشار و انتقال نمونه های بالینی مقاوم به آنتی بیوتیک بسیار کم خواهد بود.

در بین مواد ضد عفونی کننده مورد مطالعه، کمترین تاثیر بر بیو فیلم انترو کوکی در مورد پوویدون آیودین مشاهده شد. این ترکیب به عنوان یک ماده موثر ضد عفونی کننده در غلظت ۱۰ ٪ بطور متداول در مراکز درمانی مورد استفاده قرار می گیرد. در این بررسی حضور پوودین آیودین با غلظت ۱۰ ٪در چاهک های میکروپلیت، تنها ۶٪ از بیو فیلم سویه های بالینی را حذف و منجر به مرگ ۵۰٪ از سلو ل های بیو فیلم در مقایسه با چاهک های شاهد شد. پوویدون آیودین باعث حذف ۱۳در صدی بیو فیلم باکتری استاندارد و کشتن ۶۲ در صدی سلول های بیو فیلم شد. دکتر منصوری و همکاران در سال ۱۳۸۵ تاثیر پوویدون آیودین را برانترو کوک های جدا شده از عفونت ها ادراری مورد بررسی قرار دادند. ازآنجائیکه باکتری ها به صورت پلانکتونیک مورد مطالعه قرار گرفته بودند هیچ گونه مقاومتی نسبت به این ماده گزارش ننمودند و آن را در جلوگیری از رشد انتروکوک موثر دانستند (۴۱). با توجه به گزارش پرسترل دربی تاثیر بودن عملکرد پوویدون آیودین بر بیو فیلم استافیلوکوک اپیدرمایدیس و همچنین نتایج مطالعه حاضرمبنی بر تاثیر اندک این ماده در حذف و کشتن انتروکوک های مولد بیو فیلم، می توان اینگونه بیان کرد که پوویدون آیودین دارای اثر کمتری نسبت به دیگر مواد ضدعفونی کننده بر بیو فیلم انتروکوک می باشد.

با توجه به نتایج این مطالعه و حساسیت انتروکوک ها به مواد ضد عفونی کننده و نظرات محققان مبنی بر پیدایش مقاومت نسبت به بیو سایدها در میکروارگانیسم‌ها و اهمیت محیط‌های عمومی مانند بیمارستان‌ها در احتمال تکثیر و انتقال عفونت های مختلف پیشنهاد می شود تاثیرات بیوساید های مختلف در شرایط آزمایشگاهی متفاوت مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. از مقایسه نتایج سویه های بالینی با نمونه استاندارد به نظر می رسد که احتمالا اثر استفاده مکرر از بیوسایدها مخصوصا در غلظت‌های بالا می تواند در آینده باعث کسب مقاومت و عدم موفقیت در ریشه کنی باکتری های بیو فیلمی شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاران گرامی سرکار خانم فلور مظهر، دکتر نیما ایلا، مهندس سیامک نایبی و علی قدرت کهدر تامین امکانات لازم جهت انجام پروژه ما را یاری نمودند سپاسگزاری می نماییم.

منابع

۱- یلدا علیرضا ، مهرناز رسولی نژاد. نکاتی در مورد مقاومت میکروبها در برابر دارو های ضد میکروبی. مجله علوم پزشکی جمهوری اسلامی ایران، ۱۳۸۱; ۲۰(۳) صفحات ۲۲۶-۲۲۳.

2- Donskey CJ; Rice LB, (1999). The influence of antibiotics on spread of vancomycin-resistant enterococci: the potential role of selective use of antibiotics as a control measure. Clin. Microbiol. News. **21**;57–65.

3- Emori TG; Gaynes RP, (1993). An Overview of nosocomical Infection, including the role of the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Rev.; **6**(4): 428-442.

۴- رحیمی محمد کریم، میکروب شناسی زینسر. موسسه انتشارات آییژ. ۱۳۸۲.صفحات ۷۱-۷۲.

5- Stickler D. J, (2008). Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. Nature Clinical Practice Urology. **5**:598-608.

6- Manero A; Blanch A, (1999).Identification of *Enterococcus spp*. with a Biochemical Key. Appl. Environ. Microbiol.; 65(10): 4425–4430.

۷- نوروزی جمیله، باکتری های بیماری زا. انتشارات نور دانش. ۱۳۸۰. صفحات: ۴۵-۴۷

Archive of SID

www.SID.ir

8- Moellering Jr RC, (1992). Emergence of enterococcus as a significant pathogen. Clin. Infect. Dis.; **14**:1173–6.

9- Matsukawa M; Kunishima Y; Takahashi S; Takeyama K; Tsukamoto T, (2005). Bacterial colonization on intraluminal surface of urethral catheter. Urology. **65**: 440–444.

10- An Y H; Friedman RJ, (1998). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. J. biomed. Mater. Res. **43**:338-348.

11- Gristina A G, (1994). Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance. Biomaterials. **8**: 423-426.

12- Thien-Fah C; Man A; O'Toole, (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microb. **9**(1): 34-39.

13- Donlan R M; Costerton J.W, (2002). Biofilm: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev.; **15**:156-193.

14- Gubner R; Beech I.B, (2000). The effect of extra cellular polymeric substances on the attachment of *Pseudomonas* NCIMB 2021 to AISI 304 and 316 stainless steel. Biofouling. **15**: 25–36.

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

16- Merode A. E. J. van H; Mei C.van der; Busscher H.J.B; Krom P, (2006). Influence of Culture Heterogeneity in Cell Surface Charge on Adhesion and Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*. J. Bacteriol. **188**(7): 2421 - 2426.

17- Mohamed J.A; Huang W; Nallapareddy S.R; Teng F; Murray B.E, (2004). Influence of origin of isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis* . Infect. Immun.; **72**:3658-3663.

18- Donlan R.M, (2001). Biofilms and Device-Associated Infections. Emerging Infectious Diseases. **7**(2) 277-281.

19- Vincent J.L, (2003). Nosocomial infections in adult intensive-care units. Lancet. **361**: 2068–2077.

20- Stickler D.J, (2002). Susceptibility of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria to biocides: a perspective from the study of catheter biofilms. J. Appl. Microbio. **92** (Suppl): 163S–170S.

21- Potera C, (1999). Forging a link between biofilms and disease. Science. **283**:1837–1838.

22- Brisset L;Vernet-Garnier V; Carquin J; Burde A; Flament J.B; Choisy C, (1996). In vivo and in vitro analysis of the ability of urinary catheters to microbial colonization. Pathol. Biol. **44**: (5) 397-404.

23- Mohamed J.A; Huang D.B, (2007). Biofilm formation by enterococci. J. Med. Microbiol. **56**(12): 1581 - 1588.

24- Gilmore M.S; Coburn P.S; Nallapareddy S.R; Murray B.E, Enterococcal virulence. In *The Enterococci*. Edited by M.S. Gilmore. Washington, DC: American Society for Microbiology. (2002). 301–354.

25- Beer D.D; Srinivasan R, (1994). Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. J. Appl. Environ.Microbiol. **60**:4339-4344.

26- Favero M. S; Bond W.W; Chemical disinfection of medical and surgical materials In: Block ss, ed. Disinfection sterilization and preservation, 4th ed. Philadelphia: Lea& Febiger, (1991). 617-41.

۲۷- دکتر ملک زاده فریدون، مواد ضد میکروبی و مکانیسم عمل آنها. موسسه انتشارات امید. ۱۳۸۵. (فصل دوم) ۴۳-۱۰۰

28- Cerca N; Martins S; Cerca F; Jefferson K.K; Pier G.B; Oliveira R; Azeredo J, (2005). Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry.J. Antimicrob. Chemother. **56**: 331–336.

Archive of SID

www.SID.ir

29- Krieg N.R, (1998). Bergeys Manual of determinative for Bacteriology. Williams and Wilkins, New York.

30- Bauer A.W; Kirby W.M.M; Sherris J.C; Turck M, (1996). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single Disk Method. Am. J. Clin. Pathol. **45**(4): 493-496.

31- Stewart S. P; Zelver N; Hamilton A. M; Pitts B, (2003). A microtiter plate screening method for biofilm disinfection and removal. J. Microbiol.Methods. **54**: 269-276.

32- Smith J. J; McFeters G.A, (1997). Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2, 3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12. J. Microbiol. Methods. **29**(3): 161-75.

33- Elisabeth P; Miranda S; Michaela E; Sonja R; Andrea La; Wolfgang G; Manfred R, (2007). Effects of alcohols, povidone-iodine and hydrogen peroxide on biofilms of *Staphylococcus epidermidis* J. Antimicrob. Chemother. **60**(2):417-420.

34- Stepanovic S; Vukovic D; Dakic I; Savic B; Svabic-Vlahovic M, (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation. J. Microbiol. Methods.**40**(2): 175-9.

35- Smith K; Hunter Iain S, (2008). Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. J. Med. Microbiol.**57**: 966-973.

36- Russell A.D, (2002). Antibiotic and biocide resistance in bacteria. Symp. Ser. Soc. appl. Microbiol. **31**: 171-173.

37- Mah T.F.C; Toole G.A, (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology. **9:** 34–39.

38- Kacmaz B; Aksoy A, (2005). Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. Internat. J. Antimicrob. Agents. **25**: 535–538.

39- Aleyasin A; Mobarez A M; Sadeghizadeh M; Hosseini Doust R; Khoramabadi N, (2007). Résistance to vancomycin in *Entrococcus faecium* and *E.faecalis* clinical isolation. Pak. J. Med. Sci.; **23**(3): 390-393.

40- Figarolli B.M; Ossiprandi M.C, (2006). Ceppi antibiotico-resistenti in enterococcus. Ann. Fac. Medic. Vet. Di Parma. **26**: 219-234.

۴۱- منصوری شهلا، مصحفی محمد حسین، نجومی فریبا. اثرات مهار کنندگی پوویدون آیوداین و سیتریماید-سی بر اشرشیا کلی و انتروکوک مقاوم به آنتی بیوتیک. مجله دانشگاه علو م پزشکی کرمان دوره سیزدهم- شماره ۳- ۱۳۸۵. صفحات: ۱۵۲-۱۵۸.

Archive of SID

www.SID.ir