Archive of SID

مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران
سال سوم ● شماره ۴ ● صفحات ۶۹۵ تا ۷۰۰ ● زمستان ۱۳۸۴

استخراج آلژینات ازسودوموناس آئروجینوزا ومطالعه ممانعت از نفوذ آنتی بیوتیک ها ازطریق لایه آلژینات

* مژگان محمدی مهر[۱]، دکتراحیاء عبدی عالی[۲]، زهرا فلاحی[۳]، دکترنادر مرکزی مقدم[۴]

چکیده

سابقه وهدف: سودوموناس آئروجینوزا یکی از باکتری های گرم منفی، پاتوژن فرصت طلب و تولید کننده بیوفیلم است.باکتریهای مولد بیوفیلم پایداری بیشتری به درمان آنتی بیوتیکی دارند و به حملات سیستم ایمنی مقاومترند. بیوفیلم جمعیتی از سلولهای رشد کننده بر یک سطح و محصور در ماتریکس اگزوپلی ساکاریدی است. بیوفیلم ها مسئول ۶۵٪ از عفونتهای باکتریایی هستند.

مواد وروشها: این تحقیق از نوع تحقیقات پایه ای ، بر روی ۴۲ سویه سودوموناس آئروجینوزا بیمارستانی انجام شد. استخراج آلژینات به روش Govan انجام گرفت ومطالعه نفوذ آنتی بیو تیک های مختلف از طریق لایه آلژینات با روش Sandwich cup بر روی سویه۲۱۴صورت گرفت.

یافته ها: ماکرولید ها نرخ نفوذ ۱۰۰٪ نشان دادند ، آنتی بیوتیک های فلوروکینولونی وبتا لاکتامی نرخ نفوذ ۸۶٪ نشان دادند در صورتی که آمینوگلیکوزیدها نرخ نفوذ پائین تری داشتند.

نتیجه گیری : در این مطالعه نقش آلژینات به عنوان سدی در برابر نفوذ آنتی بیوتیک ها ثابت شد.

کلمات کلیدی: آلژینات ،آنتی بیوتیک ، بیوفیلم، سودوموناس آئروجینوزا

مقدمه

سودوموناس آئروجینوزا باکتری میله‌ای گرم منفی و یک پاتوژن فرصت طلب است. سویه های موکوئید این باکتری با تولید لایه گلیکوکالیکس با ویسکوزیته بالا (آلژینات) در برابر عوامل ضد میکروبی و سیستم ایمنی بدن سد دفاعی ایجاد می کند.این باکتری عامل عفونت های متنوع و گسترده‌ای بویژه در افراد مبتلا به نقص ایمنی، بیماران سرطانی، ایدزی، سیستیک فیبروزیس (CF) و سوختگی ها می شود(۱).

یکی ازمشکلات درمانی این باکتری در بیماران CF مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری به درمان های رایج آنتی بیوتیکی است که با تولید بیوفیلم مرتبط می باشد. بیوفیلم باکتری از باکتری های محصور در ماتریکس اگزوپلی ساکاریدی (آلژینات) در اتصال به سطح ایجاد می گردد و سبب مقاومت آنتی بیوتیکی و پایداری در برابر سیستم ایمنی و فاگوسیت ها می گردد (۲).

آلژینات باکتریایی به عنوان ادهسین در اتصال باکتری به سلول های اپی تلیال ریه نشان داده شده است و وظایف بیولوژیکی آن با ایجاد بیوفیلم بر سطوح زنده و غیر زنده مشخص می گردد. تولید اگزوپلی ساکارید مخاطی (آلژینات) و تشکیل بیوفیلم در بیماریزایی و مقاومت باکتری نقش حائز اهمیتی دارد. آلژینات با خاصیت ضد بیگانه خواری مانع اتصال ماکروفاژها به سطح ارگانیسم می شود و از طرفی با ممانعت از اپسونیزاسیون و فاگوسیتوز توسط سیستم کمپلمان و آنتی بادی ها به پایداری باکتری کمک می کند. مقاومت بیوفیلم باکتری ها به عوامل آنتی بیوتیک و مواد ضد عفونی کننده از سلول های رشد کننده پلانکتونیک بیشتر است، MBC آن می تواند ۱۰ تا ۱۰۰۰ مرتبه بیشتر از پلانکتونیک باشد (۳).

بدلیل داشتن مقاومت افزایش یافته به عوامل ضد میکروبی، این عفونت ها معمولا فقط با حذف ابزار پزشکی کاشتنی مثل سوندها،

۱- کارشناس ارشد ، دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران ، دانشکده پزشکی (* نویسنده مسئول)
۲- استادیار ، دانشگاه الزهرا (س)، دانشکده علوم پایه ، گروه زیست شناسی
۳- کارشناس ارشد ، دانشگاه الزهرا (س)، دانشکده علوم پایه ، گروه زیست شناسی
۴- دکترای حرفه ای عمومی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران ، مدیر پژوهش دانشگاه

www.SID.ir

Archive of SID

مفصل های مصنوعی درمان می شوند. تخمین زده شده است که بیوفیلم ها با ۶۵٪ عفونت های بیمارستانی مرتبط اند و هزینه درمان آنها سالانه بالغ بر ۱ میلیون دلار برآورد می گردد(۴).

مواد وروشها

جمع آوری نمونه:

مطالعه از نوع مطالعات پایه ای است و۴۲ ایزوله سودوموناس آئروجینوزا، از بیمارستان جمع آوری شدند. بعد از رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز واکسیداز انجام گردید؛ سپس با تست های بیوشیمیایی کشت بر روی محیطهای Triple sugar iron agar (TSI)، Tripticase soy agar Nuthrient agar(NA)، Macconkey agar (MAC) ، Acetamid agar Pagar,SIM Methyl red Indol Voges (MRVP) proskaur simmons citrate ، تعیین هویت شدند.با توجه به این مطلب که تولید بیوفیلم (آلژینات) در سویه های موکوئیدی از سویه های غیر موکوئیدی بیشتر است ، سویه ۲۱۴به عنوان سویه موکوئیدی جهت کار در مراحل بعد انتخاب شد.

مطالعه بیوفیلم بوسیله میکروسکوپ الکترونی نگاره:

الف) تشکیل بیوفیلم روی سطح سوند

ابتدا سویه ۲۱۴ از محیط اسکیم میلک به محیط TSA +۵٪ گلوکزمنتقل و به صورت خطی کشت داده شد و به مدت ۲۰-۱۶ ساعت در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد. سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند از تک کلنی ها تهیه شد و به میزان ۱ ml از آن به ۹ ml سرم فیزیولوژی استریل افزوده و پس از مخلوط کردن ۱ ml از آن به لوله حاوی ۱۹ ml محیط TSB ۵٪ گلوکز افزوده شد.چند قطعه سوند ۱/۵cm استریل به لوله ها افزوده شد. در ۲ لوله به عنوان شاهد (کنترل منفی)سوسپانسیون میکروبی اضافه نشد .۲ لوله مدت ۲۴ ساعت و لوله های دیگر به مدت هفت روز در دمای ۳۷°C گرماگذاری شدند .

ب) تثبیت بیوفیلم تشکیل شده بر سطح سوند

هر کدام از لوله های حاوی قطعات سوند به کمک ۱۰ml PBS استریل سه بار شسته به ظرف حاوی ۲/۵٪ گلوتارآلدئید در بافرفسفات ۰/۱۵ مولار با pH =۷/۳ جهت تثبیت شدن منتقل پس ازیک ساعت با بافر فسفات شستشو داده شدو به محلول اسیدتانیک۱٪ در بافرفسفات منتقل و یک ساعت بعد مجددا با ۱۰ml بافرفسفات شسته شده و جهت آبگیری در ظروف حاوی رقت های ۱۰۰٪ ,۹۰٪ ,۷۰٪ ,۲۵٪ اتانول(سه بار) به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه در دمای اتاق گرماگذاری شدند و بعد از خشک شدن در مجاورت هوا با دستگاه فریزر درایر خشک ، و با طلا coat شده و با میکروسکوپ الکترونی نگاره مدل LEO ۴۴۰i مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی مطالعه شدند(۵).

آنتی بیوتیک های مورد مطالعه:

پودرهای افلوکساسین ، جنتامایسین سولفات، سیپروفلوکساسین و سفتازیدیم از شرکت دارویی اکسیر (کارخانه دارویی Fuzhou کشور چین)و پودرهای اریترومایسین اتیل سوکسینات و آزیترومایسین از شرکت دارویی تهران شیمی به ترتیب متعلق به شرکت Biochemic ایتالیا و Sandoz اسپانیا و پودرهای آمیکاسین سولفات از شرکت داروپخش (شرکت دارویی Zhejiang Youngning چین) و ایمی پنم مصرفی در این پژوهش از پودر تزریقی این آنتی بیوتیک، متعلق به شرکت chibert-Merck sharp Dohme فرانسه تهیه شد.

استخراج آلژینات

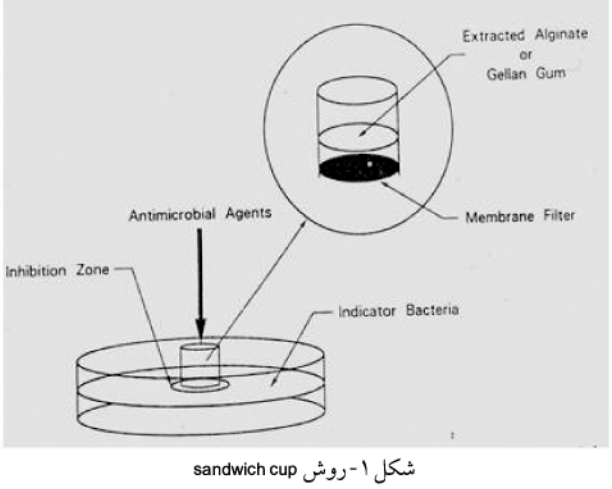
برای استخراج آلژینات از سویه مورد مطالعه ،سویه ۲۱۴ ، کشت تک کلنی روی محیط TSA داده شد. پس از گرماگذاری ۲۴ ساعته در دمای ۳۷°C در محیط های کشت MAC حاوی ۲٪ گلیسرول که به صورت شیب دار در لوله های به قطر ۲/۵cm تهیه شده بود،کشت داده شد و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۱°C گرماگذاری شد. پس از این مدت، نمونه رشد یافته بر سطح شیب دار با سرم فیزیولوژی استریل شسته و بوسیله آنس استریل از سطح جدا و به بشرهای استریل منتقل شد. و با همزن (مگنت) یکنواخت شد پس از توزیع در ویال های سانتریفوژ با سرعت ۲۰۰۰۰g در ۵°C به مدت یکساعت سانتریفوژ و رسوب آن دور ریخته شد. مایع رویی یکساعت در حمام بخار ر۸۰°Cقرار داده شد تا باکتری باقیمانده و مواد پروتئینی تخریب شودو مجددا با سرعت ۲۰۰۰۰g در ۵°C به مدت یکساعت سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ وانتقال مایع رویی به بشرهای چند برابر حجم آن، سه حجم مایع رویی، اتانل سرد ۹۵٪ که قبلا در دمای ۲۰°C- گذاشته شده بود به مخلوط اضافه شد. افزودن الکل بتدریج و همراه با چرخش محتویات بشر صورت گرفت.رسوب آلژینات با الکل مطلق شسته شد وبرای تبخیر الکل در معرض هوا قرار گرفت ،سپس به پلیت استریل یکبار مصرف منتقل و۲۴ ساعت درفریزر ۷۰°C- قرار داده شد ، پس ازآن با فریزر درایر خشک شد(۶).

بررسی نفوذ آنتی بیوتیک در لایه آلژینات با انجام متد Sandwich cup در مرکز پلیت ۱۰cm ،فیلتر استات سلولزی۰/۴ mm به قطر ۱۲ mm قرار داده شد و۲۰۰ml از محلول استریل۱٪ آلژینات استخراج شده در

www.SID.ir

Archive of SID

مرحله قبل به آرامی و دقت روی فیلتر استات افزوده شد. در مرحله بعد ۲۰ml محیط NA در دمای ۴۷°C مخلوط با ۵۰ml از سوسپانسیون میکروبی به پلیت به آرامی اضافه شد و بعد از بستن محیط ۵۰ml از غلظت ۶۴ml/g٪ (آنتی بیوتیک) به پلیت افزوده شد و با میله شیشه سرکج استریل بصورت یکنواخت پخش شد وپلیت ها در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد (آزمایش ۳ بار برای هر کدام از آنتی بیوتیک ها تکرار شد)، در پلیت کنترل تمام مراحل ذکرشده انجام شد و به جای ۱٪ آلژینات از ۱٪ آگار استفاده شد وافزودن مخلوط NA و سوسپانسیون میکروبی بعد از بستن آگار انجام شد.بعد از ۲۴ ساعت پلیت ها از انکوباتور خارج شده و قطر هاله بازداری هر کدام اندازه گیری شد .قطر هاله در پلیت شاهد (لایه آگار)۱۰۰٪ در نظر گرفته شد و در مقایسه با آن قطر هاله بازداری هر کدام از پلیت ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید(۷).

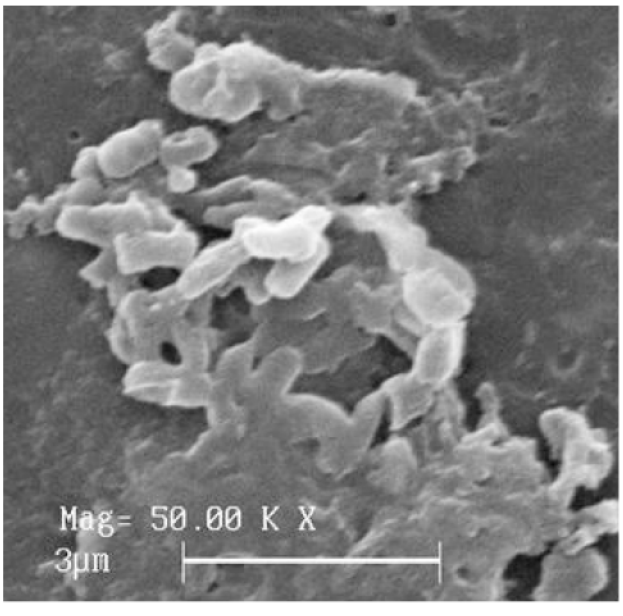


شکل ۱- روش sandwich cup

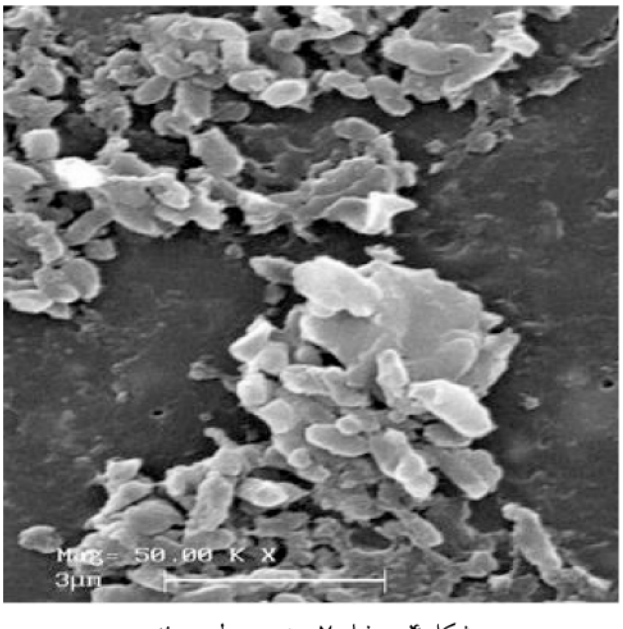
یافته ها

نتایج مطالعه میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد که ضخامت بیوفیلم تولید شده بعد از ۷ روز گرماگذاری در مقایسه با بیوفیلم ۱ روزه بیشتر است.

شکل ۲- بیوفیلم ۱ روزه بر سطح سوند



شکل ۳- بیوفیلم ۷ روزه بر سطح سوند



شکل ۴- بیوفیلم ۷ روزه بر سطح سوند

با توجه به نتایج بدست آمده از مطالعه نفوذ آنتی بیوتیک ها از لایه آلژینات ، بازداری از نفوذ آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی (جنتامایسین و آمیکاسین) نسبت به گروه های دیگر بیشتر است آنتی بیوتیک های لاکتامی و فلوروکینولونی قدرت نفوذ بالایی رانشان دادند نتایج مطالعه حاضر نفوذ ۹۵٪ برای سفتازیدیم و ۸۶٪ برای ایمی پنم را نشان داد. میزان نفوذ آمینوگلیکوزیدهای در مطالعه حاضر در مورد جنتامایسین ۷۳٪ و آمیکاسین ۵۹ ٪بود.در این مطالعه میزان نفوذ در مورد افلوکساسین حدود ۷۸٪ و در مورد سیپروفلوکساسین ۹۰٪

www.SID.ir

Archive of SID

مشاهده شد.

در مورد نفوذ ماکرولیدها، قدرت نفوذ در لایه ۱٪ آلژینات برابر با لایه ۱٪ آگار و میزان نفوذ ۱۰۰٪ را نشان دادند.

جدول ۱ - نتایج مطالعه قدرت نفوذ آنتی بیوتکی های مورد مطالعه در لایه آلژینات ۱٪

انتی بیوتیک	درصد بازداری	درصد نفوذ
جنتامایسین سولفات	۲۷	۷۳
آمیکاسین سولفات	۴۱	۵۹
افلوکساسین	۲۲	۷۸
سیپروفلوکساسین هیدروکلراید	۱۰	۹۰
آزیترومایسین	۰	۱۰۰
اریترومایسین اتیل سوکسینات	۰	۱۰۰
ایمی پنم	۱۴	۸۶
سفتازیدیم	۵	۹۵

بحث و نتیجه گیری

جهت سنجش توزیع باکتری های چسبیده به سطح می توان 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 میکروکلنی ها را به همراه دارد. این نتایج تایید کننده مطالعات Ishida و همکارانش است (۸).

بیش از ۸۰٪ بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس (CF) که به طور مزمن توسط سودوموناس آئروجینوزا کلونیزه می شوند، تحت تبدیل فنوتیپی موکوئیدی قرار می گیرند. مقاومت به آمینوگلیکوزیدها یک مشکل درمانی در بیماران CF با عفونت مزمن سودوموناس آئروجینوزا است. این باکتری عامل برونشیت مزمن در ۶۰٪ از بیماران است (۹).

یکی از مهمترین مشکلات بیوفیلم های بالغ تولرانت آنتی بیوتیکی است. تئوری های زیادی برای توضیح مقاومت آنتی بیوتیکی با واسطه بیوفیلم پیشنهاد شده است که شامل محدودیت انتشار، نرخ رشد آهسته و بیان آنزیم های متابولیز کننده دارو است. هیچکدام از عوامل قادر به توضیح مقاومت دیده شده در یک بیوفیلم مشخص نیستند (۱۰،۹).

نظرات متفاوتی درباره نقش حفاظتی گلیکوکالیکس به عنوان سد دفاعی وجود دارد. به طور خلاصه کاهش در ضریب انتشار در عرض گلیکوکالیکس و محیط مایع به تنهایی برای تولرانت بیوفیلم کافی نیست، بلکه مقاومت آنتی بیوتیک را تسهیل می کند. بررسی های جدید وجود شبکه ای از کانال ها و منافذ را در درون ماتریکس نشان داده که عوامل ضدمیکروبی بوسیله آنها می توانند به فضای بین میکروکلنی ها دسترسی پیدا کنند؛ اما بوسیله سد پلیمریک آنیونی (گلیکوکالیکس) از سلول های داخل میکروکلنی جدا می شوند. بنابراین گلیکوکالیکس نمی تواند از انتشار آنتی بیوتیک ها به درون بیوفیلم جلوگیری کند، بلکه مانع از ورود آنها به درون میکروکلنی می شود (۱۰،۹).

Baltimore وهمکارانش گزارش کردند آلژینات ترکیب عمده گلیکوکالیکس تولید شده توسط تیپ موکوئیدی سودوموناس آئروجینوزا است که در مقاومت به آمینوگلیکوزیدها نقش دارد ولی تاثیری در مقاومت به بتالاکتام ها ندارد(۱۱). این مساله می تواند اختلاف بار آنتی بیوتیک ها را توضیح دهد که آمینوگلیکوزیدها بار مثبت دارند در حالی که بتالاکتام ها بدون بار هستند. در مطالعه حاضر نفوذ هر یک از آنتی بیوتیک های مورد مطالعه در لایه آلژینات۱٪ و آگار۱٪ (شاهد) بررسی شد. با توجه به نتایج بدست آمده بازداری آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی (جنتامایسین و آمیکاسین) نسبت به گروه های دیگر بیشتر است. آنتی بیوتیک های بتا لاکتامی و فلوروکینولونی قدرت نفوذ بالایی رانشان دادند. این نتایج، با مطالعات Shigeta و همکارانش همخوانی دارد که نشان دادند بتالاکتام ها نفوذ نسبتا بالایی در لایه آلژینات دارند. البته نتایج مطالعه حاضر نفوذ ۸۶٪ برای آنتی بیوتیک های بتالاکتامی ایمی پنم را نشان داد در حالی که نفوذ بتالاکتام ها در مطالعه Shigeta حدود ۵۰٪ است. میزان نفوذ آمینوگلیکوزیدهای در مطالعه حاضر در مورد جنتامایسین ۷۳٪ و آمیکاسین۵۹ ٪ بود. در مطالعه Shigeta نفوذ آمینوگلیکوزیدها حدود ۲۵٪است که در مقایسه با نتایج ما میزان نفوذ کاهش زیادی نداشته است. در مطالعه Shigeta نفوذ فلوروکینولون ها ۱۰۰٪است ولی در مطالعه حاضر بازداری درمورد این آنتی بیوتیک ها مشاهده شد و حدود ۷۸٪ نفوذ در مورد افلوکساسین و ۹۰ ٪ در مورد سیپروفلوکساسین مشاهده شد (۱۲).

در مورد نفوذ ماکرولیدها مشابه نتایج بدست آمده از مطالعه Hiromi قدرت نفوذ در لایه آلژینات۱٪ برابر با لایه آگار۱٪ و میزان نفوذ ۱۰۰٪ را نشان دادند. بقیه نتایج در تضاد با نتایج بدست آمده از مطالعه Hiromi است که نشان دادمیزان نفوذ بتالاکتام ها و فلوروکینولون ها ۱۰۰٪است.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر در مورد آنتی بیوتیک سفتازیدیم تقریبا مشابه نتایج مطالعه Ishida است ولی نتایج بدست آمده از مطالعه سیپروفلوکساسین و جنتامایسین مشابه مطالعه Ishida نبود و بازداری از نفوذ جنتامایسین در مطالعه Ishida بیش از ۸۰٪ است در صورتی که در مطالعه حاضر درباره جنتامایسین حدود ۲۷٪ و آمیکاسین ۴۱٪ بازداری مشاهده شد (۷،۸).

انتشار کند، غلظت آنتی بیوتیک وارد شده به بیوفیلم را کاهش می دهد از طرفی آنزیم بتالاکتاماز آنتی بیوتیک وارد شده را تخریب می کند و تاثیر مشترک انتشار کند و تحلیل یافتن آنتی بیوتیک وارد شده، پایداری موثر بیوفیلم را در بیوفیلم های بیان کننده بتالاکتاماز سودوموناس آئروجینوزا فراهم می کند. یک مورد سد نفوذی در سودوموناس آئروجینوزا برای پراکسید هیدروژن در سلول های بیوفیلم ذکر شده که برخلاف سلول های پلانکتونیک به کشته شدن با ۵۰ میلی مول آب اکسیژنه حساس بودند سلول های بیوفیلم با میزان پایین تری از کاتالاز (katA) به طور موثری حمایت شدند (۱۳).

تاثیر مشترک یا همکاری بین دو عامل سد نفوذی و آنزیم های تخریب کننده مواد ضد میکروبی مشابه همکاری بین غشاء خارجی و پمپ های مقاومت چند دارویی است که مواد ضد میکروبی را از عرض سدهای نفوذپذیر انتقال می دهد. نفوذ آمینوگلیکوزیدها در بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزا با اتصال به آلژینات خارج سلولی ممانعت شده که با افزودن آلژینات لیاز محدودیت نفوذ رفع می گردد (۱۴).

تولید ماتریکس اگزوپلی ساکاریدی از ویژگی های بیوفیلم است که در ممانعت از دسترسی آنتی بیوتیک به باکتری غوطه‌ور در ماتریکس نقش دارد. البته با مدل های ریاضی حدس زده می شود خیلی از آنتی بیوتیک ها محدودیتی در نفوذ به بیوفیلم ندارند. ممانعت و بازداری همیشه نمی تواند توضیحی برای مقاومت به ترکیبات ضد میکروبی باشد. تعداد مطالعات انجام شده روی نفوذ مواد ضد میکروبی از طریق بیوفیلم کم است و بدون شک منعکس کننده مشکلات تکنیکی موثر می باشدحتی زمانی که اندازه گیری انجام می شود نتایج کاملا قابل بحث نیست (۱۵).

نظرات متفاوتی درباره نقش حفاظتی گلیکوکالیکس به عنوان سدی‌در برابر انتشار و کاهش دسترسی دارو بعد از اتصال آن وجود دارد. اینکه گلیکوکالیکس یک سد فیزیکی در برابر آنتی بیوتیک هست یا نه، به میزان زیادی به طبیعت آنتی بیوتیک، ظرفیت اتصال گلیکوکالیکس به آن و مقدار دارویی که در درمان به کار رفته است و میزان رشد کلنی نسبت به میزان انتشار و نفوذ آنتی بیوتیک بستگی دارد. با توجه به مشکلات ایجاد شده توسط بیوفیلم باکتری ها در زمینه های مختلف صنعتی، غذایی و پزشکی سعی و تلاش محققین بر این قرار گرفته است که به نحوی این باکتری ها را حذف کنند یا از تشکیل آنها جلوگیری به عمل آورند. راهبردهای متعددی در زمینه کنترل بیوفیلم پیشنهاد شده است. با این حال به دلیل آثار و جنبه های سازگاری آن بر بیمار بسیاری از درمان ها برای لوازم پزشکی کاربرد ندارد و مطالعات بیشتری را در این زمینه می طلبد (۱۴).

References

1. May TB, Shinabarger D, Mahara JR. Alginate synthesis by Pseudomonas aeruginosa :a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Rev. 1991; 4(2):191-206.

2. Sticker D. Biofilm.Current option in microbiology. 1999; 2(3):270-75.

3. Nickel J. Ruseska C, Wright JB. Costerton JW. Tobramycine resistance of Pseudomonas aeruginosa cells growing as a biofilm on urinary tract catheter. Antimicrob Agents Chemother. 1985; 27(4):619-24.

4. Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerging infectious Diseases. 2002; 8(9):881-9.

۵. محمدی مهر مژگان ، عبدی عالی احیا ، مطالعه تشکیل بیوفیلم سود و موناس آئروجینوزا با روش اصلاح شده پلیت میکروتیتر و میکروسکوپ الکترونی. مجله علمی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش ۱۳۸۳، ۱ (۲)، ۲۹۹-۲۹۵.

6. May TB, Chakrabrty AM. Isolation and assay of Pseudomonas aeroginosa alginate. Methods in Enzymology. 1994; 235: 295-304.

7. Hiromi K, Tomochika K, Matunaga T, Ogawa M. A sandwich cup method for the penetration Assay of Antimicrobial Agents through Pseudomonas

www.SID.ir

Archive of SID

Exopolysaccharides. Microbiol Immunal. 1994; 38(8):615-9.

8. Ishida H, Ishida Y, Kurosaka.Y, Otani T, Sato K, Kobayashi H. In vitro and in vivo activities of Levofloxacin against biofilm-producing Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob.Agents Chemother. 1998; 42(7):1641-5.

9. Dennis E, Ohman A, Chakrabarty M. Utilization of Human respiratory secretions by mucoid Pseudomonas aeroginosa of cystic fibrosis origin. Infection and Immunity. 1982; 37(3):615- 9.

10. Baltimore RS, Cross AS, Dobek AS. The inhibitory effect of sodium alginate on antibiotic activity against mucoid and non-mucoid of Pseudomonas aeroginosa. J. Antimicro. Chemoter. 1987; 20(6):815-23.

11. Shigeta MG, Tanaka G, Komatsuzawa H, Sugai M, Suginaka H, Usui T. Permeation of antimicrobial agents through Pseudomonas aeruginosa biofilms a simple method. Chemotherapy. 1997; 43(5):340-5.

12. Giwerman BE, Jensen TT, Hoiby N, Kharazmi A, Costerton JW. Induction of B-Lactamase production in Pseudomonas aeroginosa biofilms. Antimicrob Agents Chemoter. 1991; 35(5): 1008-10.

13. Rodney M, Costerton JW. Biofilms survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews. 2002;15(2): 167-93.

14. Macra-Litran T, Allison DG, Gilbert P. An evaluation of the potential of the multiple antibiotic resistance operon (mar) and the multidrug efflux pump acrABto moderate resistance towards ciprofloxacin in Escherichia coli biofilms.J Antimicrob.Chemother. 2000; 45(6):789-95.

www.SID.ir

Archive of SID

Alginate extration of Pseudomonas aeroginosa and study of penetratuion of antibiotic agents through alginate using a sandwich cup method.

*Mohammadimehr M; MSc[1], Abdi Ali A; PhD[2], Flahi Z; MSc[3], Markazi-Moghadam N; MD[4]

Abstract

Background: Pseudomonas aeroginosa is one of the most important oppourtunistic bacteria which produces biofilm. It has been reported that biofilm forming bacteria are more resistant to antibiotic treatment and immunologic response. Biofilms ,communities of cells adhering to a surface enclosed in a self-producing polymeric matrix. Biofilms might be responsible for 65%of bacterial infections.

Materials and methods: In this study we investigated the role of the barrier formed by alginate against antibiotic penetration .Mucoid isolates of P. aeruginosa were collected from 2 hospitals and identified by biochemical tests. Strain M214 P. aeruginosa produces more biofilm compared with other strains. Alginate was extracted from mucoid –type P. aeruginosa (M214) with method described by Goven. We evaluated the penetration of antibiotics macrolides (azithromycin,erythromycin) ,aminoglycosides (amikacin,gentamicin) lactames(imipenem,ceftazidem),fluoruqinolones(ciprofloxacin,ofloxacin) through P. aeruginosa (M214) alginate with a sandwich cup method described by Hiromi Kumon.

Results: The results indicated that macrolides demonstrated penetration rate 100% ,fluroquinolones and lactames demonstrated relatively high penetration rate>85%, whereas aminoglycosides showed low penetration (amikacin=59%,gentamicin=73%).

Conclusions: In this study, the role of alginate as a barrier against antibiotics penetration was proven.

Key words: Alginate, Antibiotic, Biofilm, P. aeruginosa

1- (* Corresponding author) Instructor, Army University of Medical Sciences, Faculty of Medicine
2- Assistant professor, Al Zahra University, Faculty of Basic Sciences, Department of Biology
3- Instructor, Al Zahra University, Faculty of Basic Sciences, Department of Biology
4- General physician, Army University of Medical Sciences, Research office manager

www.SID.ir