بررسی مقایسه ای اثر آنتی بیوتیک ها بر سویه های بالینی انتروکوک در شرایط پلانکتونیک و شرایط تولید بیوفیلم در آزمایشگاه

میترا صالحی[1]، فروغ آبانگاه*[1]، فرزانه حسینی[1]

1) گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

تاریخ دریافت: 91/3/3 تاریخ پذیرش: 91/10/13

چکیده

مقدمه: انتروکوک ها از میکروارگانیسم های کومنسال دستگاه گوارش هستند که در شرایط خاص باعث عفونت و تشکیل بیوفیلم می شوند. هدف از این مطالعه، مقایسه میزانMIC، MBC و MBEC آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، جنتامایسین، تتراسایکلین و نیتروفورانتوئین بر عدم رشد ساختار بیوفیلم سلول های انتروکوک بود.

مواد و روش ها: در این پژوهش تعداد 78 ایزوله کلینیکی از بیمارستان های شهر تهران جمع آوری شدند. شناسایی سویه ها بر اساس رشد روی محیط بایل اسکولین آگار، تحمل نمک، رنگ آمیزی، تست کاتالاز، هیدرولیز هیپورات و تخمیر قندها انجام شد. ده سویه انتروکوک حساس به آنتی بیوتیک های مذکور جهت تشکیل بیوفیلم، انتخاب شدند.

یافته های پژوهش: در مجـــموع 93 درصد از ایــزوله ها نسبت به نیتروفورانتوئین حساس بودند. بیشترین سلول های به ترتیب با نیتروفورانتوئین با غلظت های 256 و 1024 میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب بیوفیلم یک روزه و پنج روزه را متلاشی کرد. ریشه کنی بیوفیلم باکتریایی توسط عسکبرداری با میکروسکوپ الکترونی تایید شد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج به دست آمده بیانگر این مطلب است که آنتی بیوتیک نیتروفورانتوئین برای درمان عفونت های ناشی از باکتری انتروکوک در شرایط پلانکتونیک و بیوفیلم کاملاً کارآمد است.

واژه های کلیدی: انتروکوک، پلانکتونیک،بیوفیلم، نیتروفورانتوئین

* **نویسنده مسئول:** گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

Email: foroughabangah@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

انتروکوک ها به عنوان میکروفلور طبیعی دستگاه گوارش انسان و حیوانات محسوب می شوند. این باکتری تحت شرایط خاص منجر به پیدایش عفونت مجرای ادراری-تناسلی، التهاب مجاری صفراوی، اندوکاردیت، مننژیت و عفونت های جلدی می شود. گزارشات متعدد حاکی از اقزایش مقاومت های ذاتی و اکتسابی این باکتری و تولید بیوفیلم است.(۱،۲،۱۷)

حداقل 16 اپیدمی ناشی از انتروکوک های چند مقاومتی از سال 1989 تا 1998 گزارش شده است،(3). در بین اعضای جنس انتروکوک، انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم شایع ترین گونه ها در ایجاد عفونت های انسانی هستند.(4)

در سال های اخیر، افزایش قابل توجهی در میزان شیوع عفونت های انتروکوکی در سطح جهان مشاهده می شود به طوری که امروزه انتروکوک ها، به عنوان یکی از شایع ترین عفونت های بیمارستانی گزارش می شوند،(5). علاوه بر مقاومت ذاتی انتروکوک به آنتی بیوتیک ها، توانائی این باکتری جهت کلونیزه شدن در میزبان و تشکیل بیوفیلم از دیگر ویژگی های آن در پایداری و انتشار عفونت در مراکز درمانی می باشد.(۶،۷،۸)

در مطالعات متعدد از چسبندگی و اتصال موثر انتروکوک ها بر سطوح ابزارهای پزشکی، مثل کاتترهای وریدی و ادراری، لنزهای چشمی و در نهایت تولید بیوفیلم گزارش می شود،(۹،۱۰،۱۱). لایه اگزوپلی ساکاریدی از نفوذ مواد ضد میکروبی به درون بیوفیلم جلوگیری می کند از این رو باکتری های شرکت کننده در بیوفیلم، میزان بالایی از غلظت های آنتی بیوتیکی را نسبت به باکتری های پلانکتونیک تحمل می کنند. با توجه به این که انتروکوک ها یکی از اصلی ترین میکروارگانیسم ها در تشکیل بیوفیلم میکروبی بر روی سطوح و ابزار می باشد، زمینه مطالعات جدید، جهت بررسی سلامت عمومی از لحاظ بیماری های عفونی و هم چنین مقاومت آنتی بیوتیکی را فراهم می کند.

در این تحقیق تاثیر آنتی بیوتیک های رایج بر عدم رشد سویه های بالینی در شرایط پلانکتونیک و بیوفیلمی مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا الگوی مقاومت ایزوله های بالینی در شرایط پلانکتونی، نسبت به آنتی بیوتیک ها تعیین شد. سپس حساس ترین سویه ها، جهت تشکیل بیوفیلم انتخاب و مقاومت آنتی بیوتیکی در شرایط بیوفیلمی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

سویه باکتری و شرایط کشت

در این تحقیق تعداد 78 سویه بالینی انتروکوک، شامل 68 نمونه ادراری، 6 نمونه زخم، 2 نمونه ترشحات مایعات بدن و 2 نمونه از جناغ سینه از بیماران مراجعه کننده به مراکزدرمانی شهر تهران، در طی یک سال جمع آوری شدند. ابتدا از هر نمونه بالینی روی محیط افتراقی بایل اسکولین آگار کشت داده شد. پس از 24 ساعت تشکیل کلنی ها و تغییر رنگ محیط (سیاه)، که نشان دهنده هیدرولیز اسکولین است، مورد بررسی قرار گرفت. سپس کلنی ها با توجه به رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز و اکسیداز، رشد در محیط 6/5 درصد نمک، رشد در دمای 45 درجه سانتی گراد، احیای تلوریت، هیدرولیز اسید آمینه آرژینین و تخمیر قندهای آرابینوز، مانیتول، سوربیتول، لاکتوز و سوربوز تعیین هویت شدند.(12)

آزمون های سنجش حساسیت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک

حساسیت ایزوله های انتروکوک نسبت به آنتی بیوتیک های رایج مورد استفاده در مراکز بیمارستانی ایران مورد بررسی قرار گرفتند. دیسک های آنتی بیوتیک شامل جنتامایسین(10µg)، آمپی سیلین(10µg)، ونکومایسین(30µg)، اریترومایسین(15µg)، تتراسایکلین(30µg)، سیپروفلوکساسین(5µg)، کلرامفنیکل(30µg)، پنی سیلین(10Unit)، نیتروفورانتوئین(300µg)، آمیکاسین(30µg) از شرکت پادتن طب تهیه شد.

بررسی مقاومت دارویی(آنتی بیوگرام) به روش دیسک گذاری Kirby-Bauer انجام پذیرفت،(13).

Archive of SID

www.SID.ir

برای این منظور سوسپانسیون میکروبی برابر با کدورت استاندارد 0/5 مک فارلند(غلظت تقریبی 1/5 ×108 CFU/ml) از باکتری های 16 ساعته(فاز رشد) تهیه گردید و از این سوسپانسیون میکروبی برای کشت در روی محیط مولر هینتون آگار استفاده شد. میزان قطر هاله عدم رشد بعد از 24 ساعت گرماگذاری در دمای 37 درجه با کولیس اندازه گیری شد. سپس حساس ترین سویه ها نسبت به چند آنتی بیوتیک یکسان شامل آمپی سیلین، جنتامایسین، نیتروفورانتوئین، تتراسایکلین برای ادامه کار انتخاب شدند.

تعیین MIC وMBC و MBEC

در این پژوهش ابتدا کمترین غلظت بازدارنده (MIC) و کمترین غلظت کشنده(MBC) سویه های انتروکوک در شرایط پلانکتونی نسبت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین، آمپی سیلین، تتراسایکلین و نیترفورانتوئین به روش ماکرو براث دیلوشن تعیین شد.در این روش رقت سریال آنتی بیوتیکی آماده شد به طوری که محلول های آنتی بیوتیکی به غلظت های 0/5، 1، 2، 4، 8، 16، 32، 64، 128، 512 و 1024 میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد.

سپس ده سویه انتروکوک فکالیس حساس، جهت تولید بیوفیلم و بررسی تاثیر کمترین غلظت کشنده آنتی بیوتیک ها بر بیوفیلم(MBEC) انتخاب شدند. در نهایت فعالیت باکتریسیدالی هر آنتی بیوتیک در برابر سلول های بیوفیلم و سلول های پلانکتونیک مقایسه شد.

مرحله تولید بیوفیلم و تاثیر آنتی بیوتیک برآن

جهت تهیه بیوفیلم، میزان 0/1 ml از سوسپانسیون باکتریایی سویه های حساس بالینی، با کدورت 0/5 مک فارلند به محیط BHI براث، حاوی قطعه سوند(1 cm) تلقیح و نمونه ها در دمای 37 درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. تعیین فعالیت باکتریسیدالی آنتی بیوتیک ها به صورت روزانه مورد بررسی قرارگرفت. برای این منظور پس از گذشت زمان گرماگذاری و تشکیل بیوفیلم، قطعه سوند حاوی بیوفیلم سه مرتبه توسط بافر فسفات سالین استریل شستشو داده شد تا فقط سلول های بیوفیلمی متصل به سطح سوند باقی بمانند. سپس هر قطعه سوند توسط پنس استریل به درون لوله هایی که از نظر میزان غلظت برای هر آنتی بیوتیک رقت سازی شده بود، انتقال یافتند. لوله های حاوی قطعه سوند و آنتی بیوتیک مورد مطالعه، به مدت 6 ساعت به انکوباتور 37 درجه سانتی گراد منتقل شدند. بعد از گذشت این زمان و دور ریختن محیط درون هر لوله، 1 ml بافر فسفات سالین(PBS) استریل به آن افزوده و هر لوله به مدت 5 دقیقه بر روی شیکر قرار گرفت تا سلول های بیوفیلمی کشته نشده، از سطح سوند کنده شوند.

در نهایت جهت رشد احتمالی باکتری های زنده، 100 µl از سوسپانسیون هر لوله توسط لوله سرکج استریل به خوبی در سطح محیط BHI آگار پخش و پلیت ها در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد گرماگذاری و بررسی شدند،(14). پس از 24 ساعت اولین پیلتی که رشد در آن مشاهده نشد به عنوان MBEC (کمترین غلظت از آنتی بیوتیک که باعث از بین رفتن سلول بیوفیلم شود) در نظر گرفته شد. در هر آزمایش لوله شاهد حاوی یک قطعه سوند و فاقد آنتی بیوتیک بود.

مراحل بررسی بیو فیلم پس از تاثیر آنتی بیوتیک

برای آماده سازی نمونه و فیکس کردن آن، جهت بررسی با میکروسکوپ الکترونی، ابتدا لوله های حاوی قطعات سوند با بافر فسفات سالین استریل 3 مرتبه شستشو داده شدند سپس سوندها جهت تثبیت در محلول گلوتار الدئید 2 درصد حل شده در بافر فسفات 0/1 مولار، به مدت 60 دقیقه، در دمای اتاق قرار گرفتند. پس از شستشوی مجدد با PBS، سوندهای مذکور در محلول اسید تانیک 1 درصد حل شده در بافر فسفات، به مدت 60 دقیقه، در دمای اتاق نگهداری شدند. در نهایت سوندها جهت آبگیری در سری رقت های الکل اتانول(25 درصد، 50 درصد، 75 درصد، 90 درصد، 100 درصد) قرار گرفتند. پس از خشک شدن در مجاورت هوا به پلیت استریل منتقل و به مدت 24 ساعت در فریزر قرار گرفتند.

Archive of SID

www.SID.ir

در مرحله آخر قطعه سوند با طلا پوشش داده شد و عکسبرداری توسط دستگاه SEM دانشگاه علوم تحقیقات تهران انجام گرفت.(15)

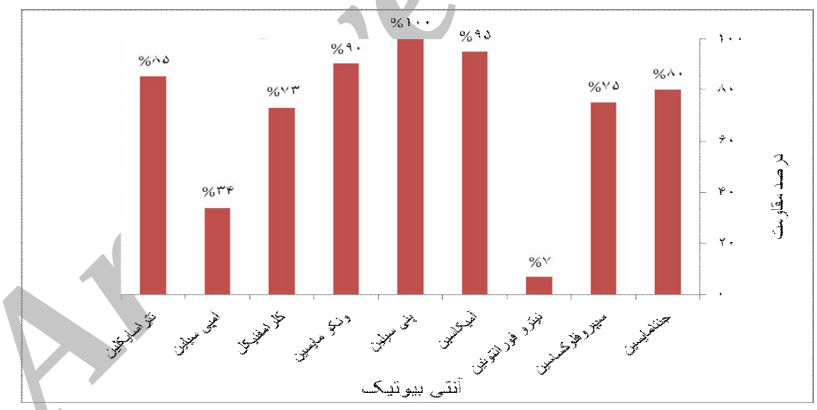
یافته های پژوهش

در مجموع از کل نمونه های جمع آوری شده، 59 ایزوله(75/7 درصد) به عنوان انتروکوکوس فکالیس، 13 ایزوله(16/6درصد) انتروکوکوس فاسیوم و 6 عدد(7/7 درصد) در حد جنس انتروکوک(Enterococcus sp) شناسایی شدند.

تعیین الگوی حساسیت ایزوله های انتروکوک نسبت به دیسک های آنتی بیوتیکی، نشان داد که میزان مقاومت به تتراسایکلین 85 درصد، آمپی سیلین 34 درصد، کلرامفنیکل 73 درصد، ونکومایسین 90 درصد، پنی سیلین 100 درصد، آمیکاسین 95 درصد، نیتروفورانتوئین 7 درصد، سیپروفلوکساسین 75 درصد، جنتامایسین 80 درصد بود.(نمودار شماره 1) بنا بر این بیشترین مقاومت نسبت به پنی سیلین و کمترین نسبت به نیتروفورانتوئین در میان نمونه های مورد مطالعه دیده شد.

نتایج تعیین MIC و MBC

نتایج طیف کمترین غلظت های باکتریوسایدی و باکتریواستاتیک آنتی بیوتیک های جنتامایسین، نیتروفورانتوئین، آمپی سیلین و تتراسایکلین در سویه های مورد مطالعه در جدول شماره 1 آورده شده است. نتایج تاثیر باکتریسیدالی آنتی بیوتیک ها علیه بیوفیلم نتایج نشان داد که آنتی بیوتیک های جنتامایسین، آمپی سیلین، تتراسایکلین در از بین بردن سویه های حساس شرکت کننده در بیوفیلم 24 ساعته، کاملاً بی تاثیر بودند. آنتی بیوتیک نیتروفورانتوئین(FM) دارای بیشترین تاثیر در مهار رشد سویه های بالینی انتروکوک در شرایط پلانکتونیک و هم چنین شرایط بیوفیلمی بود. به طوری که سویه های شرکت کننده در بیوفیلم حتی تا روز پنجم نسبت به این آنتی بیوتیک حساس بودند.(جدول شماره 2)(شکل شماره 1)



نمودار شماره 1 . درصد مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های انتروکوک ایزوله شده از بیماران

جدول شماره 1. میانگین میزان MIC و MBC آنتی بیوتیک ها علیه شکل پلانکتونیک سویه های انتروکوک

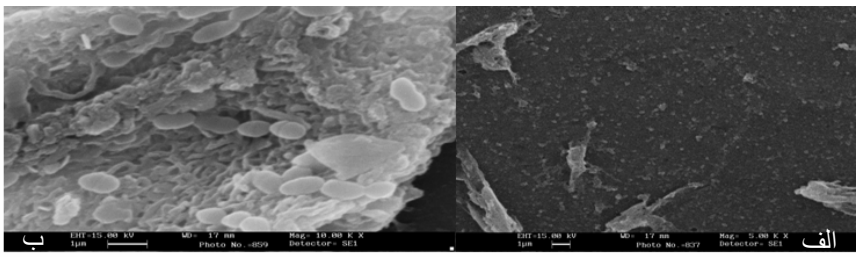
آنتی بیوتیک	محدوده MIC	محدوده MBC
جنتامایسین	16-64 µg/ml	32-512 µg/ml
تتراسایکلین	32 µg/ml	64 µg/ml
نیتروفورانتوئین	16-64 µg/ml	132-512 µg/ml
آمپی سیلین	1-2 µg/ml	132-512 µg/ml

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره 2 . غلظت باکتریسیدالی نیتروفورانتوئین در روزهای مختلف

روز	غلظت باکتریسیدالی
اول	256 µg/ml
دوم	512µg/ml
سوم	512µg/ml
چهارم	512µg/ml
پنجم	1024µg/ml



شکل شماره 1. الف تشکیل بیوفیلم 5 روزه بر سطح سوند قبل از تاثیر آنتی بیوتیک نیتروفورانتوئین، ب. پس از تاثیر آنتی بیوتیک نیتروفورانتوئین علیه بیوفیلم 5 روزه

بحث و نتیجه گیری

انتروکوک باکتری فرصت طلبی است که به علت سختی درمان یا به عبارتی مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک های رایج مورد توجه قرار گرفته است. وجود سویه های چندمقاومتی(MDR) و افزایش مقاومت به سه گروه دارویی موثر یعنی پنی سیلین ها، آمینوگلیکوزیدها و گلیکوپپتیدها درمان این گونه عفونت ها را به یک معضل بهداشتی تبدیل کرده است،(2). نیتروفورانتوئین یک آنتی بیوتیک باکتریواستاتیک و باکتریوسید برای بسیاری از ارگانیسم های گرم مثبت و گرم منفی است. مکانیسم دقیق اثر این آنتی بیوتیک کاملاً مشخص نیست و اثرات متفاوتی از تداخل در متابولیسم تا مهار پروتئین سازی را برای آن ذکر می کنند. با این حال نیتروفورانتوئین دارای چندین جایگاه گیرنده مختلف بر روی ریبوزوم است که نقش آن در مهار پروتئین سازی را بیش از پیش روشن می نماید،(16). امروزه نیتروفورانتوئین به عنوان یک آنتی بیوتیک موثر برای درمان عفونت ادراری انتروکوک مورد استفاده قرار می گیرد. در عین حال مقاومت به دیگر آنتی بیوتیک ها منجر به افزایش استفاده از این دارو شده است،(17). با توجه به شیوع کم مقاومت به نیتروفورانتوئین، این دارو فعالیت خود را بر علیه ایزوله های VRE حفظ کرده است و بر طبق گزارشات موجود در درمان عفونت های VRE در رابطه با دستگاه ادراری موثر می باشد.(17)

مطالعه تیمورنژاد در سال 89 حاکی از مقاومت سویه های انتروکوک نسبت به ونکومایسین و حساسیت آن ها نسبت به نیتروفورانتوئین بود.(18)

در تحقیق جانکوسکا در سال 2008 در بین ایزوله های انتروکوک مورد مطالعه، تمام سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک نیتروفورانتوئین حساس گزارش شدند در حالی که نسبت به آمپی سیلین، سیپروفلوکساسین و سفتریاکسون مقاومت نشان دادند.(19)

در مطالعه گئورگ در سال 2001 فعالیت نیتروفورانتوئین بر علیه 300 ایزوله فکالیس و فاسیوم و گالیناروم بررسی شد و همه سویه ها حساس به نیتروفورانتوئین گزارش شدند،(20). در مطالعه دکتر فیض آبادی فقط 14 درصد از انتروکوک ها به نیتروفورانتوئین مقاومت نشان دادند،(21). در مطالعه حاضر حساسیت ایزوله ها نسبت به نیتروفورانتوئین 93 درصد بود که با نتایج تحقیق حاصل از تاثیر این

Archive of SID

www.SID.ir

آنتی بیوتیک بر سلول های پلانکتونیک با محققین دیگر مشابهت دارد.

از میان عوامل ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی، بیوفیلم های باکتریائی سهم شاخصی را به خود اختصاص داده اند. بر طبق گزارشات موسسه سلامت آمریکا(NIH) نقش بیوفیلم در 80 درصد از عفونت های میکروبی گزارش می شود،(22). بیوفیلم انتروکوکسی ها در طیف وسیعی از وسایل پزشکی که معمولاً بیماران بستری با آن در ارتباط هستند، یافت می شوند که احتمالاً یکی از عوامل منجر به عفونت های بیمارستانی است. تشکیل بیوفیلم یک فاکتور مهم در پاتوژنز عفونت های انتروکوکی است.

ریشه کنی بیوفیلم نیاز به آنتی بیوتیک هایی دارد که بتوانند به طور مؤثر در ماتریکس بیوفیلم نفوذ کنند و بر علیه باکتری های در حال رشد فعالیت کنند. MBEC هر آنتی بیوتیک ممکن است 100-100 برابر بالاتر از MIC برای ارگانیسم یکسان در شکل پلانکتونیک باشد. بنا بر این امروزه میزان تاثیر غلظت های مختلف آنتی بیوتیک بر عفونت های بیوفیلمی به عنوان روشی برای مطالعه جهت درمان عفونت های بیوفیلم پیشنهاد شده است،(23)، زیرا باکتری ها در حالت بیوفیلمی تغییر فنوتیپی پیدا می کنند که آن ها را چندین برابر نسبت به آنتی بیوتیک ها مقاوم می کند.(24)

در مطالعه حاضر نتایج تاثیر آنتی بیوتیک های انتخابی تتراسایکلین، آمپی سیلین، جنتامایسین و نیتروفورانتوئین، نشان داد که این انتی بیوتیک ها بر عدم رشد سویه های انتروکوک در شرایط پلانکونیک تاثیر گذارند در صورتی که همین سویه ها در شرایط بیوفیلمی نسبت به غلظت های بالای آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، تتراسایکلین و جنتامایسین مقاومت نشان می دهند. در مورد نیتروفورانتوئین، علاوه بر تاثیر آنتی بیوتیک(MIC: 32 µg/ml) بر عدم رشد باکتری در شرایط پلانکتونی، این دارو در شرایط بیوفیلمی تا روز پنجم(MBEC≤1024µg/ml)کاملا قدرت ریشه کنی سلول های ساختار بیوفیلم را دارد.

در اکثر مطالعات سال های اخیر تاثیر نیتروفورانتوئین بر سلول های پلانکتونیک بررسی قرار گرفته است. تحقیقات اندکی مبنی بر تاثیر نیتروفورانتوئین بر بیوفیلم باکتریائی بررسی شده است. مطالعه مادئو شرما در سال 2009، نشان داد که نیتروفورانتوئین یکی از موثرترین آنتی بیوتیک ها، بر علیه سویه های E.coli به عنوان یکی از شاخص ترین باکتری های شرکت کننده در بیوفیلم است،(25). نتایج تحقیق حاضر از لحاظ تاثیر آنتی بیوتیک در ریشه کنی بیوفیلم انتروکوک با پژوهش مادئو شرما هم خوانی دارد تنها تفاوت آن در نوع میکرو ارگانیسم مورد مطالعه می باشد، که در هر دو مطالعه تاثیر آنتی بیوتیک نیتروفورانتوئین بر بیوفیلم نشان داده شده است در صورتی که تحقیقی مبنی بر تاثیر نیتروفورانتوئین در عدم رشد یا از بین بردن ساختار بیوفیلم انتروکوک مشاهده نشد.

از آن جا که اغلب عفونت های وابسته به کاتتر به درمان های رایج به خوبی پاسخ نمی دهند، آنتی بیوتیک تراپی بر علیه بیوفیلم تثبیت شده با وجود استفاده از داروهایی که در تست حساسیت استاندارد در invitro بسیار فعالند، شکست می خورد. در مطالعه وست در سال 2006، مقایسه نتایج MBEC آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، ونکومایسین بر علیه بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس با توجه به MIC و MBC نشان داد که MBEC آمپی سیلین و ونکوماسین 10^3 برابر بیشتر از MIC آن ها بوده است. بنا بر این غلظت بسیار بالایی از این آنتی بیوتیک ها برای جلوگیری از رشد بیوفیلم ها نیاز است،(26). گزارشات دیگر غیر موثر بودن ونکومایسین را در کشتن سلول های بیوفیلم را نشان داده اند.(۲۳،۲۷،۲۸)

چی و همکاران در سال 2007، بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس تشکیل شده بر سطح دیسک های استریل، را به مدت 1 ساعت در معرض آنتی بیوتیک های مختلف، قرار دادند. نتایج آن ها نشان داد که اریترومایسین و اوکسی تتراسایکلین قادر به از بین بردن بیوفیلم این باکتری بودند ولی آمپی سیلین، کوتریموکسازول، ونکومایسین و ونکومایسین+ جنتامایسین قادر نبودند که باکتری ها را به طور کامل در بیوفیلم ریشه کن کنند.(29)

Archive of SID

www.SID.ir

از آن جا که آمپی سیلین در عمل تقسیم باکتریایی با جلوگیری از سنتز دیواره عمل می کند، احتمالاً تأثیر این آنتی بیوتیک در مدت زمان کوتاه برای سنتز دیواره در بیوفیلم انتروکوکوس فکالیس مناسب نیست. در مطالعه حاضر با شش ساعت مجاورت این آنتی بیوتیک با سویه انتروکوک در شرایط بیوفیلمی، باز هم رشد سلول ها مشاهده شد.

به طور کلی نتایج این تحقیق بیان گر این مطلب است که هر چند MIC به عنوان روش استاندارد تشخیص حساسیت آنتی بیوتیکی مورد توجه است اما رفتار باکتری ها را در بیوفیلم منعکس نمی کند.

بنا بر این سنجش میزان MBEC، برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری های موجود در بیوفیلم، به خصوص در موارد عدم پاسخ سویه های بالینی نسبت به آنتی بیوتیک ها و یافتن روش مناسب جهت ریشه کنی بیوفیلم باکتریایی به شمار می آید.

با توجه به داده های حاصل از این تحقیق به نظر می رسد که آنتی بیوتیک نیتروفورانتوئین جهت از بین بردن سویه های بالینی انتروکوک در شرایط پلانکتونیک و بیوفیلمی در مقایسه با دیگر آنتی بیوتیک های رایج درمانی موثرتر است.

References

1-Shepard BD, Gilmore MS. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics drug introduction and resistance. Microbes Infect 2002;4:215-24.

2-Leavias H, Willems JL, Top J, Spalburg E, Mascini EM, Fluit DC et al. Epidemic and nonepidemic multidrug-resistant Enterococcus faecium. Emerg Infect Dis 2003; 9:110-4.

3-Huycke MM, Sham DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci the nature of the problem and an agenda for the future. Emerg Infect Dis1998;4:239-49.

4-Feizabadi MM, Maleknejad P, Asgharzadeh A, Asadi S, Shokrzadeh L, Sayadi S. Prevalence of aminoglycoside-modifying enzymes genes among isolates of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium in Iran. Microb Drug Resist 2006;12:265-8.

5-Donskey CJ, RiceL B. The influence of antibiotics on spread of vancomycin-resistant enterococci: the potential role of selective use of antibiotics as a control measure. Clin Microbiol News1999;21:57-65.

6-Creti R, Imperi M, Berrtuccini L, Fabretti F, Orefici G, DiRossa R et al. Survey for virulence determinants among enterococcus faecalis isolates from different sources. J Med Microbiol 2004;53:13-20.

7-Di-Rosa R, Basoli A, Donelli G, Penni A, Salvatori FM, Fiocca F et al. A microbiological and morphological study of blocked biliary stents. Microbiol Health Dis1999;11:84-8.

8-Mohamed JA,Singh KV,Huang W, Teng F and Murray BE. Influence of clinical origin and of various genes on biofilm formation by Enterococcus faecalis Microbiol Health Dis 2003;12:84-9.

9-Keane PF, Bonner MC, Johnston SR, Zafar A, Gorman SP. Characterization of biofilm encrustation on ureteric stents in vivo. Br J Uro 1994;73:687-91.

10-Dowidar N, Moesgaard F, Matzen P. Clogging and other complications of endoscopic biliary endoprostheses. Scand J Gastroenterol 1991;26:1132-6.

11-Kobayakawa S, Jett BD, Gilmore MS. Biofilm formation by Enterococcus faecalis on intraocular lens material. Curr Eye Res 2005;30:741-5.

12-Manero A, Blanch AR. Identification of Enterococcus spp. with a Biochemical Key. Appl Environ Microbiol 1999;65:4425-30.

13-Bauer AW, Kirby MM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by astandardized single Disk Method. Am J Clin Pathol1996;45:493-6.

14-Ceri H, Olson ME, Morck DW, Storey D, Read RR, Buret AG, et al. The MBEC Assay System: multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. Methods Enzymol 2001;337:377-85.

15-Mohammadi M, Abdiali E. [The study of forming Pseudomonas aeroginosa Biofilm by the modified method of microtiter plate and electron microscope]. J Army Uni 1383;259-99.(Persian)

16-Bockstael K, Van Aerschot A. Antimicrobial resistance in bacteria. Central Eur J Med 2009;4:141-55.

17-Rahbar M, Hajia M, Farzanekhah M. Activity of nitrofurantion against uniray tract infection(UTI) isolates of vancomycin-

Archive of SID

www.SID.ir

resistent enterococci(VRE). Iran J Pathol 2007;4:171-4.
18-Teymournejad O, Mohabati MA, Hosseini DR. [Nitrofurantoin sensitivity in vancomycin resistant enterococcus]. Arak Med Uni J 2010;13:26-31.(Persian)
19-Jankoska G, Trajkovska-Dokic E, Panovski N, Popovska-Jovanovska K, Petrovska M. Virulence factors and antibiotic resistance in enterococcus faecalis isolated from urine samples. Bio Med Sci 2008;9:57-66.
20-Georg G, Zhanel D, Hoban J, James A. Nitrrofurantoin is active against vancomycin resistant Enterococci. Bio Med Sci 2001;45:324-6.
21-Feizabadi M, Aliahmadi A, Mobasheri F, Asgharzadeh A. Phenotypic characteristics and population genotisce of enterocous faecalis cultured from patients in Tehran during 2000-2001. J Microbial 2001;49: 645-9.
22-Lewis K. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother 2001;45: 999-1007.
23-Sandoe JA, Wysome J, West AP. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. J Antimicrob Chemother 2006;57:767-70.
24-Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Kober DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. Ann Rev Microbiol 1999;49:711-45.
25-Madusharma AS, Yada V, Uma C. Biofilm production in uropathogenic Escherichia coli. Ann Rev Microbiol 2009;2:294-9.
26-West SA, Griffin A. Social evolution theory for microorganisms. Nat Rev Microbiol 2006;4:597-607.
27-Laplante KL, Mermel LA. In vitro activities of telavancin and vancomycin against biofilm-producing Staphylococcus aureus, S. epidermidis and Enterococcus faecalis. Antimicrob Agents Chemother 2009;53: 3166-9.
28-Sepandj F, Ceri H, Gibb A, Read R, Oslon M. Minimum inhibitory concentration versus minimum biofilm eliminating concentration in evaluation of antibiotic sensitivity Enterococci causing peritonitis. Peritoneal Dial Int 2010;27:464-8.
29-Chai L, HamimahH, Cheng C. Susceptibility of Enterococcus faecalis biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. Ann Rev Microbiol 2007;49:161-6.

Archive of SID

www.SID.ir

Comparison of The Effects of Antibiotics on Clinical Enterococci Strains in Planktonic and Biofilm Formation Condition, In Vitro

Salehi M[1], Abangah F[1], Hoseini F[1]*

(Received: 23 May. 2012 Accepted: 2 Jan. 2013)

Abstract

Introduction: Enterococci are the comm.-ensally organisms of gastrointestinal tract and frequently cause biofilm formation and infections. The purpose of the study was to compare the effects of the antibiotics ampicillin, gentamaicin, tetracycline and nitrofurantoin on enterococcal biofilms through MIC, MBC and MBEC assays.

Materials & Methods: In the present study 78 clinical samples were collected from Tehran hospitals. Identification of the isolated strains was based on the growth on Bilesculin agar culture, tolerance against 6.5% Nacl, gram staining, catalase test, hydrolysis of hyporate and fermentation of carbohydrates. Ten enterococcal isolates sensible to the antibiotics were selected for biofilm formation.

Findings: Collectively, more sensibility to nitrofurantoin was seen in 93% of the isolates. The majority of cells in the biofilm were eradicated at the low levels of nitrofurantoin, namely, 256 µg/ml for one-day biofilm and 1024 µg/ml for five-day biofilm. The eradication of biofilms was corroborated by electron microscopy observation.

Discussion & Conclusion: The results demonstrated that nitrofurantoin could be efficiently used for the treatment of enterococcal infections in planktonic and biofilm condition.

Keywords: enterococci, planktonic, biofilm, nitrofurantoin

1. Dept of Microbiology, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran
** (corresponding author)*

Archive of SID

www.SID.ir