اثر آنتی بیوتیک های کینولونی و ماکرولیدی بر سلولهای پلانکتونیک و بیوفیلم *Pseudomonas aeruginosa* در شرایط آزمایشگاهی

مژگان محمدی مهر[1*] ، احیاء عبدی عالی[2]

۱.کارشناس ارشد ومربی دانشکده پیراپزشکی- دانشگاه علوم پزشکی ارتش
۲. استادیار دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهراء(س)
* نشانی برای مکاتبه: تهران ، خیابان فاطمی غربی، خیابان شهید اعتمادزاده جنب بیمارستان ۵۰۱ دانشکده پزشکی ، دفتر ارزیابی تحصیلی، تلفن ۸۸۳۳۷۹۲۳
mjgnmehr20@ yahoo.com،

دریافت مقاله: مهر هشتاد و شش **پذیرش برای چاپ: آذر هشتاد و شش**

چکیده

سابقه و هدف: *Pseudomonas aeruginosa ، باکتری گرم منفی و پاتوژن فرصت‌طلب 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 حاصل از بیوفیلم با درمان مواد ضد میکروبی مشکل است. هدف از این مطالعه مقایسه فعالیت باکتریسیدالی آنتی بیوتیک های کینولونی و ماکرولیدی در برابر سلول‌های پلانکتونیک و بیوفیلم بود.*

روش کار: *این مطالعه پایه ای بر روی۴۲ایزوله Pseudomonas aeruginosa ، بیمارستانی انجام شد.برای تعیین ظرفیت تولید بیوفیلم ایزوله‌های Pseudomonas aeruginosa از آزمون پلیت میکروتیتر استفاده شدو سویه ۲۱۴ از ۴۲ سویه مورد بررسی با بیشترین میزان تولید بیوفیلم برای کار انتخاب شد.پس از تعیین MIC آنتی‌بیوتیک ها، فعالیت باکتریسیدالی آنها در برابر سلول‌های بیوفیلم و سلول‌های پلانکتونیک بررسی شد.*

یافته ها: *سلولهای بیوفیلم در غلظت MIC ۶۴ افلوکساسین وMIC ۱۶ سیپروفلوکساسین در مقایسه با سلولهای پلانکتونیک ریشه کن شدند و درغلظت ۲۵۶۰ µg/ml آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولیدی از بین رفتند.*

نتیجه گیری: *اختلاف آشکاری در فعالیت باکتریسیدالی آنتی‌بیوتیک‌های کینولونی و ماکرولیدی بین سلول‌های پلانکتونیک و بیوفیلم نشان دهنده مقاومت بیوفیلم نسبت به پلانکتونیک است.*

واژگان کلیدی: ***Pseudomonas aeruginosa ،آنتی بیوتیک ، پلانکتونیک، بیوفیلم***

مقدمه

Pseudomonas aeruginosa باکتری میله‌ای گرم منفی و یک پاتوژن فرصت طلب است. ویرولانس این باکتری به فاکتورهای سطح سلول شامل پیلی ، فلاژل ، ادهسین های غیر پیلی ، اگزوتوکسین ها ، پروتئاز و بیوفیلم بستگی دارد. این باکتری عامل عفونت‌های متنوع و گسترده‌ای بویژه در افراد مبتلا به نقص ایمنی، بیماران سرطانی، ایدزی، سیستیک فیبروزیس (CF) و سوختگی‌ها می‌شود (۱،۲).

یکی ازمشکلات درمانی این باکتری، مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن به درمان‌های رایج آنتی‌بیوتیکی است که با تولید بیوفیلم مرتبط می‌باشد. بیوفیلم باکتری از اجتماع 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 (۳،۴).

امروزه کارگذاشتن وسایل مصنوعی و پروتزها مانند سوندهای ادراری، سوندهای درون رگی، لنزهای داخل چشمی و تماسی، دریچه‌های قلبی و شنت‌های مغزی-نخاعی و مفاصل مصنوعی بسیار متداول گردیده است (۵). از میان وسایل پزشکی ، 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 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 (۶،۷) بیوفیلم ها می‌توانند ۱۰۰۰-۱۰ مرتبه پایداری بیشتری به اثرات عوامل ضد میکروبی داشته باشند (۸،۹) و مکانیسم‌های مقاومت بیوفیلم به عوامل ضد میکروبی مکرر بحث شده است.

تشکیل بیوفیلم در پروستاتیت مزمن باکتریایی توسط Nickle و همکارانش توسط سویه‌های مختلف باکتریایی از جمله *P. aeruginosa* نشان داده شده است (۷). با توجه به مشکلات درمانی عفونت های ایجاد شده توسط بیوفیلم باکتریایی در این تحقیق مقاومت بیوفیلم *Pseudomonas aeruginosa*در مقایسه با فرم پلانکتونیک(شناور) آن در برابر آنتی بیوتیک های ماکرولیدی و کینولونی بررسی شد.

روش کار

در این مطالعه پایه ای ۴۲ سویه *Pseudomonas aeruginosa* ، از بیمارستان جمع‌آوری شدند ابتدا رنگ آمیزی گرم ،تست کاتالاز واکسیداز انجام گردید سپس با تست‌های بیوشیمیایی(کشت بر روی محیط های MR-VP broth, Pagar, Trypticase Soy Broth و SIM, Acetamid agar) تعیین هویت شدند.(۵،۱۰)

پودرهای افلوکساسین و سیپروفلوکساسین از شرکت دارویی اکسیر متعلق به کارخانه دارویی Fuzhou کشور چین و پودرهای اریترومایسین اتیل سوکسینات و آزیترومایسین از شرکت دارویی تهران شیمی به ترتیب متعلق به شرکت Biochemic Italy و Sandoz Spain تهیه شدند.

برای بررسی تولید بیوفیلم به روش پلیت میکروتیتراز بین سویه‌های جمع آوری شده ۲۴ سویه موکوئیدی انتخاب شد. سویه‌ها از محیط اسکیم میلک به محیط کلمبیا آگار منتقل ویک شبانه روز در دمای ۳۷˚C گرماگذاری و سپس نمونه‌ها به محیط TSA تقویت شده با ۰/۲٪ گلوکز به صورت تک کلنی پاساژ داده شدند. مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷˚C گرماگذاری و بعد از آن تک کلنی‌ها به محیط TSB+۰/۲٪ گلوکز تلقیح گردیده و پس ازمخلوط کردن محتویات لوله, جذب نوری معادل۰/۱ در طول موج ۶۵۰ نانومتر برای هر نمونه تنظیم شد در مرحله بعد ۱۰۰ µl از هر نمونه به ۶ چاهک موازی در پلیت میکروتیتر ۹۶ چاهکی پلی استیرن افزوده شد و در یک ردیف ۶ تایی چاهک از محیط TSB, به عنوان شاهد منفی استفاده گردیدو در دمای ۳۷˚C به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. پس از این مدت, محتوی چاهک‌ها به آرامی به کمک سرسمپلرهای استریل آسپیره گردید و بافر A (بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۱ مولار ایزوتونیک با سالین pH=۷/۵) به میزان ۲۰۰ µl به هر چاهک اضافه شد ومحتوی هر چاهک آسپیره گردید. درمرحله بعد ۱۵۰ µl متانل خالص (۹۹٪) به هر چاهک افزوده و در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه جهت تثبیت سلول‌های متصل به کف و جدار چاهک قرار داده شدند پس از آسپیره به هر چاهک ۲۰۰ µl رنگ کریستال ویوله ۱٪ w/v افزوده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند و بعد ازآسپیراسیون برای حذف رنگ اضافه , پلیت به دقت در زیر جریان آرام شیر آب شسته شد و بعد از خشک شدن در مجاورت هوا, به هر چاهک ۱۶۰ µl اسید استیک گلاسیال $\frac{V}{V}$ ۳۳٪ افزوده شد پس از آن به کمک دستگاه Elisa Reader جذب هر چاهک در طول موج ۵۷۰ nm خوانده شد (آزمایش ۳ بار تکرار شد). (۱۱)

برای تعیین MIC آنتی‌بیوتیک‌های کینولونی(افلوکساسین و سیپروفلوکساسین) و ماکرولیدی (اریترومایسین اتیل سوکسینات و آزیترومایسین) بر سویه مورد بررسی، به روش رقت‌سازی در پلیت‌های میکروتیتر، (Microdilution broth) بر اساس پروتکل NCCLS سال ۱۹۹۷ عمل شد(۱۲). تعیین فعالیت باکتریسیدالی آنتی بیوتیک ها در برابر سلولهای بیوفیلم وپلانکتونیک با استفاده از روش‌های اشاره شده در تولید بیوفیلم و با تغییراتی در روش‌های مذکور انجام گرفت (۴). در ارلن‌هایی به حجم ۱۰۰ml, میزان ۱۸/۸ml محیط TSB ریخته شد پس از استریل کردن محیط به کمک فیلتراسیون ۱ml قند گلوکز ۵٪ به ارلن‌ها اضافه شد و ۲۰۰µl از سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند به ارلن اضافه شد و ۴ قطعه سوند ۱/۵cm در هر ارلن به کمک پنس استریل وارد شد، ارلن‌ها به مدت ۶ روز در دمای ۳۷ °C گرماگذاری شدند .

پس از دوره گرماگذاری ارلن‌های حاوی قطعات سوند از انکوباتور خارج شده و ابتدا به دقت محیط کشت هر ارلن سرریز شده 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 منتقل شد و بعنوان سلول‌های پلانکتونیک (شناور) استفاده شد برای هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه ،محلول‌های آنتی‌بیوتیکی به غلظت‌های MIC (۱۶، ۴، ۱) ،در مرحله دوم غلظت‌های MIC (۱۲۸، ۶۴، ۳۲) و در مرحله سومMIC (۵۱۲، ۲۵۶) و نهایتاً µg/ml ۱۲۸۰و۲۵۶۰ تهیه شد. در این مرحله به لوله‌های محلول‌های آنتی‌بیوتیکی تهیه شده در مرحله قبل ،قطعات سوند(سلول بیوفیلم) یا سوسپانسیون میکروبی (سلول پلانکتونیک) افزوده شد و لوله‌ها به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ °C گرماگذاری شدند.به یک لوله کنترل مثبت که فقط حاوی محیط کشت ۳ml Muller Hinton Broth بود یک قطعه سوند (بیوفیلم) و در لوله دیگر ۱ml از سوسپانسیون (سلول پلانکتونیک) اضافه شد پس از اتمام دوره گرماگذاری لوله‌ها در مرحله قبل در مورد لوله‌های آنتی‌بیوتیکی برای قطعه سوند، پس از سرریز کردن محیط, قطعه سوند به لوله حاوی ۱ml بافرفسفات سالین PBS استریل منتقل و پس از ۵ دقیقه مخلوط کردن ۱ml از آن به لوله اول سریال رقت اضافه شد برای سلول پلانکتونیک ۱ ml به لوله اول سریال اضافه و CFU/ml تعیین شد. برای انجام CFU ، در رقت‌های سریال ۱۰ تایی از لوله حاوی سلول پلانکتونیک پس از ورتکس کردن لوله ۱ml به اولین لوله رقت سریال اضافه شد و پس از ورتکس کردن۱ ml به لوله دوم اضافه و بهمین ترتیب تا آخرین لوله عمل شد و از لوله آخر هم ۱ml به بیرون ریخته شد و از هر لوله سریال رقت به میزان ۰/۱ml در پلیت‌های ۱۰cm محیط NA ریخته شد و بوسیله میله شیشه‌ای سرکج استریل به صورت یکنواخت پخش شد و در انکوباتور ۳۷˚C یک شبانه روز گرماگذاری شد (۳ پلیت برای هر رقت). در مورد لوله‌های آنتی‌بیوتیکی برای 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 (به منظور جداشدن سلول‌های باکتری چسبیده (بیوفیلم) به سطح سوند), ۱ml از آن به لوله اول سریال رقت اضافه شد و مانند مرحله توضیح داده شده برای سلول پلانکتونیک بقیه مراحل انجام شد(۱۰).

یافته ها

با توجه به میزان جذب نوری نمونه‌های مورد بررسی سویه ۲۱۴ با OD جذب نوری ، معادل ۲/۸۶ به عنوان سویه برتر در تولید بیوفیلم برای ادامه کار انتخاب شد. MIC در سلولهای پلانکتونیک شامل سیپروفلوکساسین هیدروکلراید=µg/ml ۰/۲۵ ، افلوکساسین = µg/ml ۰/۵ اریترومایسین اتیل سوکسینات = µg/ml ۴ و آزیترومایسین = µg/ml ۴ بود.

فعالیت باکتریسیدالی : با توجه به نتایج،درمورد سیپروفلوکساسین هیدروکلراید، تعداد سلول‌های پلانکتونیک پس از ۶ ساعت تیمار آنتی‌بیوتیکی درغلظت MIC از 10^6 CFU/ml به 10^2 CFU/ml کاهش یافت،در حالی که سلول‌های بیوفیلم یک مرتبه کاهش لگاریتمی نشان دادند. در غلظت ۴MICسلول‌های پلانکتونیک کاملاً ریشه‌کن شدند و سلول‌های بیوفیلم به 10^4 CFU/ml کاهش یافتند و در غلظت ۱۶MIC سلول‌های بیوفیلم کاملاً ریشه‌کن شدند.(جدول۱). در مورد افلوکساسین پس از ۶ ساعت تیمار آنتی‌بیوتیکی درغلظتMIC از سلول‌های پلانکتونیک کاملاً ریشه‌کن شدند اما سلول‌های بیوفیلم یک مرتبه کاهش لگاریتمی نشان دادند و در غلظت ۶۴MIC کاملاً ریشه‌کن شدند.(جدول۲)برای آزیترومایسین در غلظت MIC تعداد سلول‌های حیاتی پلانکتونیک از 10^6 CFU/ml به 10^5 CFU/ml کاهش یافت و در تعداد سلول‌های بیوفیلم کاهش کمی مشاهده شد. در غلظت ۴MIC تعداد سلول‌های پلانکتونیک به 10^4CFU/ml و تعداد سلول‌های بیوفیلم به 10^5CFU/ml کاهش یافت. در غلظت ۱۶MIC 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 چندانی نشان نداد. در غلظت ۶۴MIC تعداد سلول‌های پلانکتونیک کاملاً ریشه‌کن شدند و در تعداد سلول‌های بیوفیلم کاهش چندانی دیده نشد. در غلظت ۱۲۸MIC تعداد سلول‌های بیوفیلم به 10^3 CFU/ml کاهش یافت و در غلظت ۱۲۸۰ µg/ml تعداد سلول‌های بیوفیلم به 10^2 CFU/ml کاهش یافته و در غلظت ۲۵۶۰ µg/ml کاملاً ریشه‌کن شدند. (جدول۳)اریترومایسین اتیل سوکسینات در غلظت MIC در تعداد سلول‌های حیاتی پلانکتونیک و بیوفیلم کاهش کمی مشاهده شد. در غلظت ۴MIC تعداد سلول‌های پلانکتونیک و بیوفیلم از 10^6 CFU/ml به 10^5 CFU/ml کاهش یافت و در غلظت MIC ۱۶ تعداد سلول‌های پلانکتونیک به 10^4 CFU/ml و در تعداد سلول‌های بیوفیلم کاهش کمی دیده شد. در غلظت ۳۲MIC تعداد سلول‌های پلانکتونیک به 10^3CFU/ml و تعداد سلول‌های بیوفیلم به 10^4CFU/mlکاهش یافت. در غلظت ۶۴MIC تعداد سلول‌های پلانکتونیک به 10^2 CFU/ml و سلول‌های بیوفیلم کاهش چندانی دیده نشد. در غلظت ۱۲۸MIC سلول‌های پلانکتونیک کاملاً ریشه‌کن شدند و تعداد سلول‌های بیوفیلم به 10^3 CFU/ml کاهش یافت و در غلظت ۱۲۸۰ µg/ml تعداد سلول‌های بیوفیلم به 10^2 CFU/ml کاهش یافته و در غلظت ۲۵۶۰ µg/ml کاملاً ریشه‌کن شدند(جدول۴).

جدول ۱ : میانگین تعداد سلول‌های بیوفیلم و پلانکتونیک در غلظت‌های مورد بررسی سیپروفلوکساسین

غلظت آنتی بیوتیک µg/ml	تعداد سلول‌های بیوفیلم CFU/ml			
	میانگین	Std.Error	میانگین	Std.Error
MIC	۱۱۴/۸۸×۱۰^۵	۵/۷۶	۶۲۹/۳۳×۱۰^۲	۱۵/۶۷
۴MIC	۴۸/۵×۱۰^۴	۱/۴۶	۰	۰
۱۶MIC	۰	۰	۰	۰
تعداد اولیه سلول‌ها	۲۰۰/۱۱×۱۰^۶	۱۶/۵	۶۴۷/۷۷×۱۰^۶	۲۶/۲۶

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

غلظت آنتی بیوتیک µg/ml	تعداد سلول‌های بیوفیلم CFU/ml		تعداد سلول‌های پلانکتونیک CFU/ml	
	Std.Error	Std.Error	میانگین	Std.Error
MIC	۸۷/۱۱×۱۰^۵	۳/۰۴	۰	۰
۴MIC	۲۶۷/۳۳×۱۰^۴	۱/۶۲	۰	۰
۱۶MIC	۱۱۷/۵۵×۱۰^۳	۹/۴۶	۰	۰
۳۲MIC	۶۶/۸۸×۱۰^۲	۴/۴۵	۰	۰
۶۴MIC	۰	۰	۰	۰
تعداد اولیه سلول‌ها	۳۰/۷۹×۱۰^۶	۳/۴۵	۱۹۷/۶۸×۱۰^۶	۱۵/۱۷

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

غلظت آنتی بیوتیک µg/ml	تعداد سلول‌های بیوفیلم CFU/ml		۶	
	میانگین	Std.Error	میانگین	Std.Error
MIC	۵۸/۶۶×۱۰^۶	۲/۱۴	۲۵۵/۴۶×۱۰^۵	۵/۹۷
۴MIC	۱۴۳/۵۵×۱۰^۵	۱۳/۳۸	۸۱۲×۱۰^۲	۱۴/۳۴
۱۶MIC	۱۶۶/۶۶×۱۰^۴	۲/۲۷	۶۸۴/۴۴×۱۰^۳	۱۶/۵۸
۳۲MIC	۱۰۸×۱۰^۴	۵/۲۸	۵۰۱/۷۷×۱۰^۲	۱۶/۸۷
۶۴MIC	۸۱/۵۵×۱۰^۴	۶/۰۸	۰	۰
۱۲۸MIC	۲۲۸/۵۵×۱۰^۳	۱۳/۲۷	۰	۰
۱۲۸۰ µg/ml	۱۷۰/۴۴×۱۰^۲	۴/۱۹	۰	۰
۲۵۶۰ µg/ml	۰	۰	۰	۰
تعداد اولیه سلول‌ها	۱۸۷/۳۳×۱۰^۶	۱۴/۷	۱۵۱/۱۱×۱۰^۶	۱۰/۱۹۴

جدول ۴ : میانگین تعداد سلول‌های بیوفیلم و پلانکتونیک در غلظت‌های مورد بررسی اریترومایسین

غلظت آنتی بیوتیک µg/ml	تعداد سلول‌های بیوفیلم CFU/ml		تعداد سلول‌های پلانکتونیک CFU/ml	
	میانگین	Std.Error	میانگین	Std.Error
MIC	۴۵/۳۳×۱۰^۶	۳/۷۲	۱۳۲/۹۳×۱۰^۶	۸/۳۷
۴MIC	۲۶۵/۱۱×۱۰^۵	۱/۴۸	۳۴۱/۷۷×۱۰^۵	۱۲/۶۱
۱۶MIC	۱۸۲/۴۴×۱۰^۵	۹/۸۷	۲۸۳/۵۵×۱۰^۴	۹/۰۸
۳۲MIC	۲۲۹×۱۰^۴	۵/۸۷	۳۹۱/۵۵×۱۰^۳	۱۳/۷۸
۶۴MIC	۹۴×۱۰^۴	۳/۸۹	۲۹۲/۴۴×۱۰^۲	۷/۲۲
۱۲۸MIC	۱۶۰/۷۷×۱۰^۳	۳/۶۵	۰	۰
۱۲۸۰ µg/ml	۱۳۴/۲۲×۱۰^۲	۲/۷۴	۰	۰
۲۵۶۰ µg/ml	۰	۰	۰	۰
تعداد اولیه سلول‌ها	۲۲۱×۱۰^۶	۲/۹۵×۱۰^۶	۱۵۱/۱۱×۱۰^۶	۱۰/۹۴×۱۰^۶

بحث

شواهدی موجود است که بیوفیلم باکتریایی سبب اندوکاردیت در بیمارانی می شود که جایگزینی دریچه مصنوعی در قلبشان دارند همچنین در بیمارانی که عفونت توسعه یافته است نرخ مرگ و میر بیش از ۷۰٪ است(۱۳).

پاتوژنز عفونت‌های مربوط به وسایل پزشکی(کاشتنی) بسیار پیچیده است و به خصوصیات میزبان, میکروارگانیسم و وسیله پیوند شده وابسته است. فرآیند تولید بیوفیلم چند مرحله‌ای است که شامل جذب, چسبیدن, تجمع و ایجاد میکروکلنی‌هاست. کلیه مراحل بوسیله فاکتورهای غیراختصاصی مثل هیدروفوبیسیتی, بار الکتروستاتیک و یا فاکتورهای اختصاصی مثل ادهسین‌ها و پیلی وساطت می‌شود(۱۴).

در بررسی کیفی تشکیل بیوفیلم ازروش‌های تست لوله‌ای و پلیت میکروتیتر استفاده می‌شود. در این تحقیق از روش پلیت میکروتیتر استفاده شد، که مزیت آن ایجاد سوبسترای استاندارد جهت اتصال باکتری‌هاست. این روش وابسته به دانسیته نوری سلول‌های باکتریایی چسبیده است و بنابراین در زمانی که دانسیته باکتریایی روی سطح کم باشد غیر حساس است، جهت اصلاح این عیب از اسید استیک در مرحله پایانی استفاده شد. در این روش با افزودن اسید استیک قادر به اندازه‌گیری غیر مستقیم باکتری‌های متصل شده به کف و دیواره چاهک می‌شویم. اسید استیک رنگ متصل به سلول‌های چسبیده به کف چاهک را بخوبی رنگ متصل شده به سلول‌های چسبیده به دیواره حل می‌کند و باعث دقت در تعیین میزان بیوفیلم ایجاد شده می‌گردد(۱۲).

در توافق با نتایج Stepanovic و بررسی‌های انجام شده توسط Susanne و همکارانش رابطه مستقیمی بین افزایش میزان تولید بیوفیلم و جذب نوری وجود دارد و سویه ۲۱۴ که نسبت به دیگر سویه‌ها کلنی موکوئیدتر بر سطح پلیت تولید کرده بود جذب نوری بالاتری را نشان داد (۱۱،۱۵).

MIC و MBC سلول‌ها در بیوفیلم می‌تواند ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ مرتبه بیشتر از سلول های پلانکتونیک باشد. MIC و MBC معیارهای استاندارد آزمون‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی‌اند و به عنوان مرجع مهم در درمان عفونت‌های حاد به کار گرفته می‌شوند بویژه به 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 حالی که آنتی‌بیوتیک برای درمان سلول‌های بیوفیلم به کار می‌رود در نتیجه درمان با شکست مواجه می‌شود(۱۶،۴،۱۴).

Maki و همکاران (۱۷) متوجه شدند سوندهای وریدی مرکزی (CVC) نسبت به سایر لوازم پزشکی که در بدن وارد می‌شوند بیشتر در معرض آلودگی و عفونت قرار دارند. ممکن است استقرار و تشکیل بیوفیلم طی ۳ روز پس از سوند گذاری انجام شود. در مطالعه آنان سویه‌های آلوده کننده شامل *P. aeruginosa* ، *S.aureus* بود.

در سال ۱۹۹۱, Evans ، Allison (۱۸) حساسیت بیوفیلم‌های *E.coli* و *P.aeruginosa* را نسبت به سیپروفلوکساسین بررسی و به تأثیر میزان رشد در ایجاد حساسیت توجه کردند و نشان دادند که بیوفیلم‌های *P.aeruginosa* به میزان زیادی نسبت به سلول‌های پلانکتونیک مقاومتر ندو این مقاومت را به فنوتیپ موکوئید باکتری نسبت دادند.

در مطالعه دیگری نشان داده شد تیمار با غلظت ۱۲۸MBC پیپراسیلین در ۲۴ ساعت تعداد سلول‌های بیوفیلم را از 10^8CFU/ml به 10^6 سلول کاهش می‌دهد و تیمار با ۶۴MBC پس از ۴۸ ساعت تعداد سلول‌های بیوفیلم را به 10^3CFU/ml کاهش می‌دهد. بیوفیلم باکتریایی با غلظت ۶۴MBC سیپروفلوکساسین و لوفلوکساسین پس از ۲۴ ساعت کاملاً ریشه‌کن شد (۱۹).

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

مطابق بانتایج بدست آمده توسط H.ceri (۲۰) و Evans(۱۸) سیپروفلوکساسین کارایی مناسبی علیه سلول‌های بیوفیلم دارد و در غلظت‌های پایین سلول‌های بیوفیلم را کاملاً ریشه‌کن می‌کند. این مسئله برخلاف نتایج بدست آمده از مطالعه T.Goto (۱۹) است که نشان داد درغلظت ۶۴MIC سیپروفلوکساسین پس از ۲۴ ساعت سلول‌های بیوفیلم از بین رفتند. در مطالعه حاضر تأثیر افلوکساسین در مقایسه با دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها در برابر سلول‌های بیوفیلم تائید کننده مطالعات Amyl (۲۱) است و مؤید آنست که فلوروکینولون‌ها می‌توانند به عنوان اولین انتخاب در درمان عفونت‌های سوند ایجاد شده توسط *P.aeruginosa* استفاده شوند.

در مورد آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولیدی هم مقاومت بالای سلول‌های بیوفیلم به‌این آنتی‌بیوتیک‌ها بیانگر نامناسب بودن کاربرد آنها در درمان است. این مسأله بر خلاف مطالعات Martin (۲۲) و Isabelle (۱۵) است که نشان دادند آزیترومایسین و اریترومایسین در درمان عفونت‌های مزمن در بیماران CF مؤثرند.

با توجه به نتایج واختلاف آشکار بین سلولهای بیوفیلم وپلانکتونیک ، لزوم راهکارهای درمانی دیگری را علاوه بر درمان آنتی بیوتیکی در مورد بیماریهای بیوفیلم نشان می دهد.

درمان عفونت‌های باکتریایی ناشی از تشکیل بیوفیلم بر روی دستگاه‌های پزشکی کار گذاشتنی به نظر می‌آید مهمترین جنبه مبارزه با بیوفیلم باشد. در این زمینه Costerton (۲۳) از میدان الکتریکی ضعیف و کمتر از $100\mu A/cm^2$ برای افزایش کارآیی عمل آنتی‌بیوتیک در برابر بیوفیلم استفاده کرده است.

با توجه به‌این که میدان‌های الکتریکی می‌توانند بر روی غشاهای بیولوژیک اثر بگذارند احتمالاً به نفوذ عوامل ضدمیکروبی در درون بیوفیلم کمک کرده و در نتیجه غلظت آنتی‌بیوتیک لازم برای از بین بردن بیوفیلم را کاهش می‌دهد(۶،۲۳،۲۴).

با توجه به مشکلات ایجاد شده توسط بیوفیلم باکتری‌ها در زمینه‌های مختلف صنعتی, غذایی و پزشکی سعی و تلاش محققین بر این قرار گرفته که به نحوی این باکتری‌ها 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 جنبه‌های سازگاری آن بر بیمار بسیاری از

REFERENCES

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

2. 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).4,191-206

3. David Sticker.Biofilm. Current Option in Microbiology.(1999),2,270-275

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

5. Perez-Giraldo ,G.,A.Rodrigueaz-Benito ,F.J.Moran C.Hurtado,M.T.Blanco ,A.C.Gomez-Garacia. Influence of N-Acetycystein on the formation of biofilm by Staphylococcus epidermidis . J.Antimicrob.Chemother.(1997),39,643-646

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

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

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

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

10. Woods ,G.L,F Washington ,A. Antimicrobial susceptibility test :dilution and disk diffusion methods .In Murray.PR (ed) Mannual of clinical microbiology 6th ed.ASM press.(1995) p.1327-1341

۱۱. محمدی مهر.مژگان،عبدی عالی احیاء.مطالعه تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزا با روش اصلاح شده پلیت میکروتیتر و میکروسکوپ الکترونی.مجله علمی وپژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش،۱۳۸۳-(۱)،۲۹۹-۲۹۵الکترونی.مجله علمی وپژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش،۱۳۸۳-(۱)،۲۹۹-۲۹۵

12. National Committee for Clinical laboratory standards NCCLS Methods for dilution Antimicrobial susceptibility tests for bacteria grown aerobically .4th.ed.Approved standard M7-A4.Wayne PA,USA,NCCLS.1997

13. Antonio Finelli ,Claude V.Gallant ,Keith J ,Lori L B.Use of In-Biofilm expression Technology To Identify Genes Involved in Pseudomonas aeruginosa Biofilm Development.J . Bacteriology.(2003) ,2700-2710

14. Rodney M.Donlan . Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerging infectious Diseases.(2002). ,8(9),881-889

15. Susan ,Haubler,Isabell ,Zieger ,Alexander,Lottel. Highly adherent small-colony variants of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis lung infection. Journal Medical Microbiology.(2003) ,52,295-301

16. Isabelle Vallet ,John W.Olsen ,Stephen Lory ,Andree Lazdunski Alain Filloun. The chaperon/usher pathways of Pseudomonas aeruginosa :Identification of fimbrial gene cluster (cup) and their involvement in biofilm formation. PNAS , (2000),98(2),6911-6916

17. Maki ,D.G.Infections by intravascular devices used for infusion therapy pathogenesis ,prevention and management .(1994).p.155-212.In A.L.Bisno and F.A.Waldovogal (ed).Infections associated with indwelling medical devices.2nd ed American Society for Microbiology,Washington ,D.C

18. Evans, D.J, D.G.Allison ,M.R.W.Brown, P.Gilbert.Susceptibility *Pseudomonas aeruginosa* and Escherichia coli biofilms towards Ciprofloxacin : effect of specific growth rate. J.Antimicrob.Chemother.(1991). ,27,177-184

19. Toshihiro goto ,Yasuhiko Nakame ,Morio Nishida Yoshitada Ohi. In vitro bactericidal activities of ß-Lactamase,Amikacin and Fluoroquinolones against Pseudomonas aeruginosa biofilm in Artificial urine. Urology .(1999),53,1058-1062

20. .HCeri ,M.E.Olsen ,C.Stremick ,R.R.Read ,D.Morck ,A.Buret.The calgary biofilm device:New Technology rapid Determination of Antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J .Clinical Microbiology.(1999). ,37(6),1771-1776

21. Amyl L.Spoering ,Kim Lewis.Biofilms and planktonic cells of Pseudomonas aeruginosa have similar resistance to killing by Antimicrobials .J . Bacteriology.(2001) ,183(23)p.6746-6757

22. Martin H.Schoni. Macrolide antibiotic therapy in patients with cystic fibrosis. SWISS MED WKLY.(2003) ,(133) 297-301

23. Christoph A Fux , Stoodley P , Hall L.Stoodley and J William Costerton.Bacterial biofilms:a diagnostic and therapeutic challenge. Expert Rev.Anti-infect.Ther, .(2003).1(4)667-683

24. Hatch ,R.A,N.L.Schiller.Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother , .(1998). 42 ,974-977

25. Rodney M,Donlan and J William Costerton. Biofilms survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews .(2002),15(2) ,167-193