فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۴، تابستان ۱۳۹۴، صفحه ۸۳- ۹۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۱۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۰۴

تأثیر کلرهگزیدین بر بیوفیلم برخی باکتری‌های بیماری‌زای انسانی جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی

عزیزاله ابراهیمی کهریزسنگی: استادیار پاتوبیولوژی، دانشگاه شهرکرد، ایران، a_karizsangi@yahoo.com
زیبا شعبان پور: کارشناس ارشد باکتری‌شناسی، دانشگاه شهرکرد، ایران، z_sh1388@yaho.com
سعید حبیبیان: دانشیار علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، ایران، habibian@vet.sku.ac.ir
رضا حکیمی آلنی *: دانشجوی دکتری باکتری‌شناسی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، r.hakimi91@basu.ac.ir
مجید همتی: کارشناس ارشد باکتری‌شناسی، دانشگاه شهرکرد، ایران، m_hemati1@yahoo.com
فاطمه افلاکیان: کارشناس ارشد باکتری‌شناسی، دانشگاه شهرکرد، ایران، fatemeh_aflakiyan@yahoo.com
مهدی دخت فرج: کارشناس ارشد باکتری‌شناسی، دانشگاه شهرکرد، ایران، shervindokhtfaraj@yahoo.com

چکیده

مقدمه: بیوفیلم‌ها جمعیتی از سلول‌های باکتری هستند که با تولید پلی‌مرهای خارج سلولی و ایجاد ماتریکس اگزوپلی ساکاریدی موجب اتصال برگشت‌ناپذیر باکتری‌ها به سطوح می‌شوند. ایجاد بیوفیلم باعث مقاومت باکتری نسبت به عوامل ضد میکروبی شده و می‌تواند به بروز مشکلات حاد در این زمینه منجر شود.

مواد و روش‌ها: بررسی حاضر با هدف ارزیابی تشکیل بیوفیلم در برخی ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوزا* (۱۳ مورد)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۳ مورد)، *انتروباکتر* (۱۳ مورد) و *اسینتوباکتر* (۱۳ مورد) جدا شده از عفونت‌های انسانی بیمارستان الزهرا اصفهان انجام گرفت. جدایه‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی تأیید شدند و در ادامه حداقل غلظت مهار کننده (MIC) کلرهگزیدین و تأثیر آن بر روی رشد پلانکتونی و تشکیل بیوفیلم توسط این جدایه‌ها بررسی شد. تجزیه‌های آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزارهای SPSS نسخه ۲۰ و Excel انجام شد.

نتایج: همه جدایه‌ها (۵۲ مورد) بیوفیلم تولید کردند. میانگین حداقل غلظت مهارکننده کلرهگزیدین برای باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروباکتر* و *اسینتوباکتر* به ترتیب ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۰۱۳، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۰۳ گرم بر میلی‌لیتر بود. رشد پلانکتونی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروباکتر* در حضور کلرهگزیدین در ۶۰ درصد موارد در MIC ۱/۴ و در ۴۰ درصد موارد در MIC ۱/۸ و برای باکتری‌های *اسینتوباکتر* و *استافیلوکوکوس اورئوس* ۴۰ درصد موارد در MIC ۱/۴ و ۶۰ درصد موارد در MIC ۱/۸ مهار شده بود. بیوفیلم در هیچ یک از رقت‌های MIC و ۲MIC تولید نشد، و با کاهش رقت ضدعفونی کننده قدرت تشکیل بیوفیلم به شکل معناداری افزایش پیدا کرد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج نشان داد که استفاده از کلرهگزیدین در غلظت‌های مناسب (MIC) می‌تواند از تشکیل بیوفیلم در گونه‌های مختلف باکتری‌های عامل عفونت‌های بیمارستانی جلوگیری کند اما دوزهایی از کلرهگزیدین که کم‌تر از MIC هستند می‌توانند محرک تولید بیوفیلم باشند.

واژه های کلیدی: بیوفیلم، کلرهگزیدین، *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروباکتر*، *اسینتوباکتر*

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی از علل شایع و مهم مرگ و میر و افزایش طول مدت بستری بیماران، افزایش هزینه‌های بیمارستانی و مشکلات بهداشتی هستند (۱). میکروارگانیسم‌های متفاوتی می‌توانند باعث بروز عفونت بیمارستانی به شکل اندمیک و اپیدمیک شوند با وجود این، باکتری‌ها ۹۰ درصد از عفونت‌های بیمارستانی را به خود اختصاص می‌دهند که در بین آن‌ها *اشریشیا کلی*[1] شایع‌ترین عامل بیماری‌زا بوده و پس از آن *استافیلوکوکوس اورئوس*[2] در مرتبه دوم قرار دارد (۲). *سودوموناس آئروژینوزا*[3] یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی در طیف وسیعی از بیماران دارای نقص سیستم ایمنی شامل مبتلایان به بدخیمی‌ها، سیستیک فیبروزیس[4] و سوختگی‌هاست (۳).

برای کنترل بیوفیلم باکتریایی با استفاده از ضدعفونی کننده‌ها پژوهش‌های زیادی انجام شده است. در بین این ضدعفونی کننده‌ها، کلرهگزیدین[5] آنتی‌سپتیکی است که بر طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و همچنین، برخی از قارچ‌ها و برخی از ویروس‌ها از جمله ویروس عامل ایدز و هپاتیت و بر بیوفیلم‌های باکتریایی مؤثر است (۴). از مزایای این آنتی‌سپتیک آن است که به سطح سوبستراهای زیادی بدون از دست دادن فعالیت ضدعفونی خود اتصال می‌یابد و همچنین، به آرامی آزاد می‌شود که این عمل به تداوم غلظت مؤثر آن در محیط منجر می‌شود (۵). دی استات کلرهگزیدین[6] و دی‌گلوکونات کلرهگزیدین[7]، دو شکل نمکی کلرهگزیدین هستند که فعالیت شدید آنتی‌باکتریال[8] دارند. دی‌گلوکونات کلرهگزیدین در آب و الکل محلول بوده و از این رو در دهان شویه‌ها برای ممانعت از ایجاد پلاک دهان به کار می‌رود (۶).

بیوفیلم توده‌ای از باکتری‌ها را در بر می‌گیرد که روی یک سطح جامد به یکدیگر می‌چسبند و بر روی هم اثر متقابل دارند. پیرامون آن‌ها را ماتریکس خارجی از جنس پلی ساکارید احاطه می‌کند (۷). بیوفیلم‌هایی که با یک گونه باکتری به وجود می‌آیند، مونوکالچر[9] نامیده شده است ولی بیوفیلم‌های تشکیل شده روی سطوح مخاطی مانند روده که بیشتر آمیزه‌ای از گونه‌های گوناگونی از باکتری‌ها هستند را مولتی کالچر[10] گویند (۸). میکروب‌ها، بیوفیلم را در پاسخ به عوامل مختلفی تشکیل می‌دهند، که این عوامل ممکن است شامل شناسایی جایگاه‌های اتصال اختصاصی و یا غیر اختصاصی سلول بر روی یک سطح باشد و یا در برخی موارد، از طریق در معرض قرار گرفتن سلول‌های پلانکتونی در برابر غلظت‌های تحت مهاری آنتی‌بیوتیک‌ها انجام می‌گیرد (۹).

هدف اصلی این پژوهش بررسی تعیین حداقل غلظت مهاری[11] ضدعفونی کننده کلرهگزیدین بر بیوفیلم حاصل از برخی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اسینتوباکتر*[12] و *انتروباکتر*[13] جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی است.

مواد و روش ها

نمونه‌های باکتریایی مشکوک به *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اسینتوباکتر* و *انتروباکتر* از آزمایشگاه میکروبیولوژی بیمارستان الزهرا اصفهان که از موارد عفونت‌های بیمارستانی بودند

دریافت شده و برای انجام آزمون‌های تأییدی به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی شهرکرد منتقل شد. آزمون‌های بیوشیمیایی مربوط به تأیید و تشخیص هر گونه بر اساس روش موجود در کتاب تکنیک‌های عملی در آزمایشگاه تشخیصی باکتری شناسی انجام گرفت(۱۰).

آزمایش بیوفیلم به روش تندولکار[۱۴] و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام گرفت (۱۱). برای انجام این کار جدایه‌های مورد بررسی در محیط TSB به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از این مدت نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت RPM ۶۰۰۰ سانتریفیوژ و رسوب حاصل با ۵ میلی‌لیتر از TSB استریل مخلوط شد و جذب نوری سوسپانسیون حاصل در ۵۹۵ نانومتر به عدد ۱ رسانده شد. به هر ایزوله یک ردیف ۱۲ تایی از میکروپلیت اختصاص و به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده به آن اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محتویات میکروپلیت دور ریخته شده و سه مرتبه با فسفات بافر سالین[۱۵] شستشو داده شد. در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله[۱۶] ۲ درصد اضافه شد. ارزیابی تأثیر ماده ضدمیکروبی در کاهش ضخامت بیوفیلم و میزان مرگ باکتری‌های بیوفیلم از طریق محاسبه جذب نوری انجام شد. در هر میکروپلیت یک ردیف به کنترل منفی اختصاص داده شد به این منظور محیط TSB خالص و بدون باکتری به هر گروه اضافه شد و تمامی مراحل یاد شده بر روی آن انجام گرفت.

برای تعیین حداقل غلظت مهاری کلرهگزیدین ۵۰ میکرولیتر از محلول ۱ درصد کلرهگزیدین، با همین مقدار از محیط تریپتوز سوی براث[۱۷] (TSB) در گوده اول میکروپلیت مخلوط شد. سپس، عمل رقت‌سازی در گوده‌های دیگر انجام شد. در مرحله بعد، ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه نیم مک فارلند[۱۸] باکتری مورد نظر با ۹/۹ میلی‌لیتر TSB استریل مخلوط شده و از این سوسپانسیون به مقدار ۵۰ میکرولیتر به هرگوده میکروپلیت اضافه شد. سرانجام میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

در ادامه به منظور بررسی اثر کلرهگزیدین بر رشد پلانکتونی باکتری و تشکیل بیوفیلم از جذب نوری[۱۹] (OD) استفاده شد. برای بررسی اثر کلرهگزیدین بر رشد پلانکتونی باکتری‌ها، ابتدا از محیط کشت ۲۴ ساعته باکتری مورد نظر غلظت نیم مک فارلند تهیه شد. ۵۰ میکرولیتر از باکتری فوق و همین مقدار از رقت‌های مختلف کلرهگزیدین (رقت‌های MIC1:16، MIC1:8، MIC1:4، MIC1:2، MIC و MIC2) در هر چاهک مخلوط شد و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رشد پلانکتونی باکتری‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر[۲۰] اندازه‌گیری شد. در بررسی تأثیر کلرهگزیدین بر ایجاد بیوفیلم باکتری‌ها از روش تندولکار و همکاران استفاده شد و غلظت‌های یاد شده کلرهگزیدین به گوده‌های میکروپلیت قبل از گرمخانه‌گذاری اضافه شد.

در انتها تجزیه و تحلی‌های آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزارهای SPSS نسخه ۲۰ و اکسل[۲۱] انجام شد. مقایسه‌ی میانگین صفات با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن[۲۲] در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی تولید بیوفیلم در جدول ۱ ارائه شده است. در این روش ابتدا میزان OD نمونه و تراکم نوری کنترل منفی[۲۳] (ODc) محاسبه شد و بر حسب کمتر یا بیشتر بودن میزان OD به ODc، در چهار گروه فاقد بیوفیلم ($OD \leq ODc$)، بیوفیلم ضعیف ($ODc < OD \leq 2\ ODc$)، بیوفیلم متوسط ($2OD < OD < 4\ ODc$) و بیوفیلم قوی ($OD > 4ODc$) قرار گرفتند. نکته قابل توجه عدم تشکیل بیوفیلم ضعیف در *سودوموناس آئروژینوزا* بود.

برای تعیین MIC از جدایه‌هایی استفاده شد که بیوفیلم متوسط تا قوی را تشکیل داده بودند. آزمایش‌ها در ۳ نوبت تکرار شد. MIC که برابر است با پایین‌ترین غلظت مهارکننده که مانع از رشد قابل مشاهده باکتری می‌شود پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. نتایج میزان MIC ضدعفونی کننده کلرهگزیدین بر چهار باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروباکتر* و *اسینتوباکتر* به ترتیب ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۰۱۳، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۰۳ گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. نتایج تأثیر کلرهگزیدین بر رشد پلانکتونی در چهار باکتری مورد مطالعه انجام گرفت. نتایج به شکل خلاصه در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱- بررسی تولید بیوفیلم

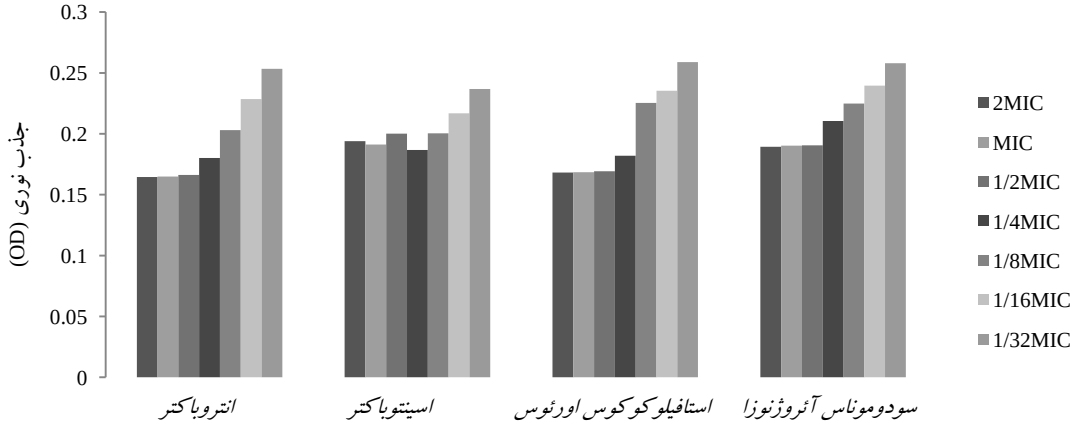
عنوان	بیوفیلم ضعیف	بیوفیلم متوسط	بیوفیلم قوی
استافیلوکوکوس اورئوس	۴ (۳۱ درصد)	۸ (۶۲ درصد)	۱ (۷ درصد)
سودوموناس آئروژینوزا	صفر	۸ (۶۲ درصد)	۵ (۳۸ درصد)
انتروباکتر	۳ (۲۳ درصد)	۶ (۴۶ درصد)	۴ (۳۱ درصد)
اسینتوباکتر	۲ (۱۲ درصد)	۵ (۳۸ درصد)	۶ (۴۶ درصد)

جدول ۲- رشد پلانکتونی در حضور ضدعفونی کننده کلرهگزیدین

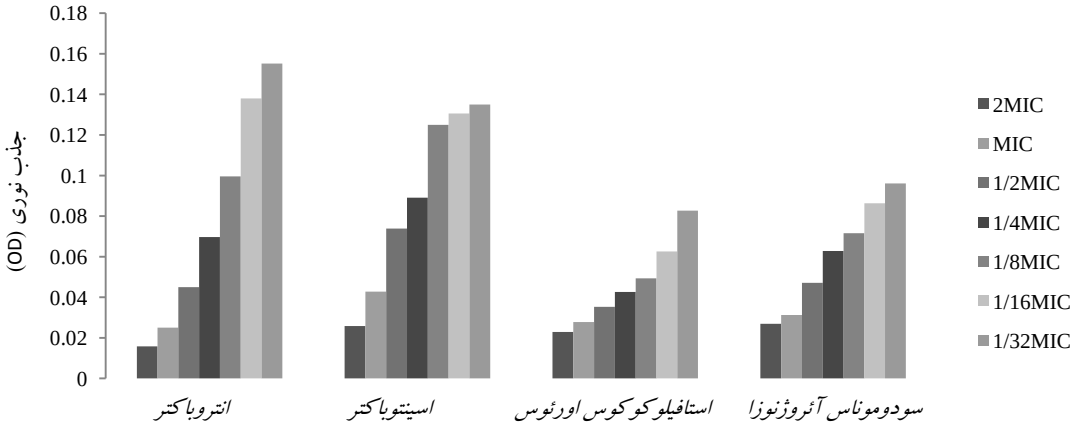
باکتری	2 MIC	MIC	MIC 1:2	MIC1:4	MIC1:8	MIC 1:16
سودوموناس آئروژینوزا	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	۴	۶	–
استافیلوکوکوس اورئوس	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	۴	۶	–
انتروباکتر	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	۶	۴	–
اسینتوباکتر	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	۴	۶	–

*اعداد نشانگر تعداد ایزوله‌های رشد یافته است.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین رشد پلانکتونی و بیوفیلمی چهار باکتری مورد بررسی در معرض رقت‌های مختلف کلرهگزیدین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن به شکل جداگانه در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. به جز در اسینتوباکتر، در بقیه باکتری‌ها با کاهش MIC میزان جذب نوری زیاد می‌شود که ناشی از کاهش غلظت مهار کننده کلرهگزیدین و به دنبال آن افزایش رشد باکتری‌هاست. همچنین، جذب نوری در بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به بقیه باکتری‌ها خیلی کمتر بود که این نشان دهنده حساسیت زیاد این باکتری به کلرهگزیدین است (شکل ۲).



شکل ۱- میانگین رشد پلانکتونی باکتری‌ها در حضور ضدعفونی کننده کلرهگزیدین



شکل ۲- میانگین رشد بیوفیلم باکتری‌ها در حضور ضدعفونی کننده کلرهگزیدین

میزان افزایش کدورت گوده‌های مربوط به باکتری‌های یاد شده نسبت به گوده حاوی رقت MIC در جدول‌های ۳ و ۴ نمایش داده شده است. در جدول ۳ با افزایش غلظت کلرهگزیدین میزان جذب نوری هم زیاد شده است که در واقع به این خاطر است که با رقیق شدن کلرهگزیدین افزایش تشکیل بیوفیلم در گوده‌های میکروپلیت انجام شده و به دنبال آن جذب رنگ کریستال ویوله توسط این بیوفیلم‌ها زیاد شده است. در نتیجه در مرحله رنگ بری میزان زیادی از این رنگ در گوده‌ها آزاد شده و افزایش OD را سبب شده است. همچنین، در جدول ۴ هم با رقیق شدن کلرهگزیدین افزایش رشد پلانکتونی و به دنبال آن افزایش OD به شکل معنادار (در سطح $P\ value \leq 05$) انجام شده است. برای بررسی وجود رابطه بین رشد پلانکتونی و بیوفیلمی چهار باکتری مورد مطالعه، از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. با محاسبات انجام شده ضریب همبستگی بین رشد پلانکتونی و بیوفیلمی برابر ۰/۵۷۹ به دست آمد. بنابراین، در سطح احتمال ۹۹ درصد بین رشد پلانکتونی و بیوفیلمی آن‌ها رابطه معناداری وجود داشت و با افزایش رشد پلانکتونی، میزان رشد بیوفیلمی نیز افزوده می‌شد.

جدول ۳- درصد افزایش OD در غلظت‌های مختلف کلرهگزیدین نسبت به غلظت MIC در مرحله رشد بیوفیلمی

نام باکتری	غلظت اولیه	جدایه باکتری									
		۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
انتروباکتر	MIC : 2/1	−۱۷/۵	−۱۴/۹	۱۲/۵۸	۱۶/۷۶	۱۳/۶۸	۱۹/۴۱	۵۶/۹۵	۲۰/۵۷	۴۱/۱۸	۱۶/۷۶
	MIC : 4/1	−۱۰	۷/۶۹	۳۶/۲۳	۲۶/۵۳	۲۳/۳۶	۶۰	۶۵/۴۷	۶۹/۲۳	۳۸/۷۰	۳۷/۱۲
	MIC 8/1 :	۶/۷۸	۳۶/۹۶	۴۸/۲۴	۳۶/۸۴	۴۱/۴۳	۵۰/۷۱	۷۶/۸۸	۸۱/۰۸	۵۷/۵۸	۵۵
	MIC 16/1 :	۲۶/۴۲	۶۶/۴۸	۵۶/۸۶	۴۴/۸۳	۵۰	۶۴/۲۹	۸۵/۶۳	۸۴/۲۳	۵۹/۰۲	۶۵/۳۰
	MIC 32/1 :	۳۸/۷۲	۶۹/۴۳	۶۴/۸۰	۵۴/۸۶	۵۹	۶۵/۰۸	۸۷/۱۵	۸۴/۷۸	۶۱/۳۳	۶۹/۳۰
استینتوباکتر	MIC : 2/1	۴/۰۰	۱/۳۵	۸/۹۲	۸/۹۵	۴/۸۳	۸/۷۰	۷۱/۹۲	۶/۱۱	۱۲/۸۰	۸/۶۱
	MIC : 4/1	۱۸/۰۹	۸/۷۱	۳۹/۰۲	۱۶/۴۳	۴۸/۳۱	۲۲/۲۲	۶۲/۸۸	۲۵/۱۳	۳۰/۱۹	۱۹/۵۸
	MIC 8/1 :	۲۰/۵۳	۱۴/۴۰	۴۱/۳۹	۳۱/۳۸	۵۷/۸۰	۲۹/۷۱	۶۶/۷۸	۳۲/۷۲	۷۵/۴۴	۲۴/۵۱
	MIC 16/1 :	۷۴/۵۲	۲۴/۱۴	۶/۵۴	۵۶/۰۲	۵۹/۵۳	۴۳/۶۲	۶۷/۰۸	۴۱/۶۰	۴۴/۰۰	۳۰/۴۷
	MIC 32/1 :	۳۲/۷۷	۳۵/۴۸	۴۶/۳۴	۵۶/۹۱	۶۱/۰۲	۴۹/۷۰	۶۷/۵۵	۴۳/۸۵	۴۸/۳۶	۳۴/۷۵
استافیلوکوکوس اورئوس	MIC : 2/1	۱۰/۶۹	۱۰/۲۴	۵/۷۳	۷/۵۱	۲۴/۲۹	۴/۷۶	۱۴/۲۹	۱۸/۱۸	۷/۶۳	۱۶/۳۰
	MIC : 4/1	۱۲/۸۸	۴۴/۹۳	۳۲/۱۱	۱۲/۰۹	۳۵/۴۰	۱۵/۶۱	۰/۵۰	۲۳/۰۸	۹/۴۵	۲۵/۴۹
	MIC 8/1:	۳۷/۱۷	۲۸/۷۵	۳۶/۴۸	۱۷/۵۳	۴۲/۳۹	۳۰/۸۰	۲۴/۷۱	۲۶/۲۳	۲/۱۳	۳۲/۳۳
	MIC 16/1 :	۴۷/۶۰	۳۶/۶۷	۵۲/۵۶	۳۴/۶۹	۵۰/۲۳	۳۶/۷۱	۳۰/۷۷	۳۰/۵۰	۲۳/۰۸	۴۲/۷۷
	MIC 32/1 :	۵۴/۷۸	۴۶/۴۸	۷۷/۲۰	۴۴/۴۴	۶۱/۱۷	۴۰/۸۳	۳۲/۷۸	۳۲/۵۸	۳۱/۳۴	۴۳/۲۸
سودوموناس آئروژینوزا	MIC : 2/1	۰/۴۶	۱۸/۳۷	۹/۴۷	۷/۱۴	۱۸/۶۹	۷/۴۶	۴۳/۴۳	۳۶/۲۵	۱۴/۲۹	۳۶/۳۱
	MIC : 4/1	۲۷/۰۹	۲۷/۲۷	۱۹/۳۸	۱۰/۳۴	۲۴/۲۸	۴۹/۱۸	۵۱/۷۰	۴۱/۷۱	۳۳/۸۶	۴۳/۵۰
	MIC: ۱/۸	۳۰/۳۵	۳۳/۰۵	۳۳/۹۵	۳۰/۸۵	۲۶/۸۰	۴۲/۶۶	۵۷/۸۶	۵۱/۶۶	۴۶/۵۰	۴۸/۱۹
	MIC : ۱/۱۶	۳۳/۵۴	۴۴/۰۶	۳۶/۷۶	۴۲/۴۸	۳۰/۷۷	۶۰/۳۴	۶۴/۵۹	۵۷/۸۵	۶۷/۸۲	۴۰/۳۰
	MIC : ۱/۳۲	۴۱/۸۷	۴۹/۳۷	۲۹/۴۳	۴۹/۰۲	۳۶/۳۳	۶۲/۲۷	۶۶/۷۴	۳۶/۶۵	۷۲/۲۸	۶۰/۲۴

جدول ۴- درصد افزایش OD در غلظت‌های مختلف کلرهگزیدین نسبت به غلظت MIC در مرحله رشد پلانکتونی

نام باکتری	غلظت اولیه	جدایه باکتری									
		۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
انتروباکتر	MIC : ۱/۲	۰/۵۰	−۰/۴۶	۰/۳۲	۱/۳۶	−۰/۴۲	۰/۳۵	۰/۵۳	۰/۲۵	۰/۸۳	۰/۴۵
	MIC : ۱/۴	۲/۸۶	۵/۸۲	۲/۸۴	۶/۲۱	۴/۴۴	۱/۰۶	۳/۶۳	۱۱/۱۶	۳/۳۴	۳/۵۲
	MIC : ۱/۸	۷/۸۵	۹/۳۲	۴/۴۵	۹/۱۶	۷/۲۴	۴/۵۰	۷/۶۵	۱۵/۴۶	۱۴/۸۴	۲۱/۷۵
	MIC : ۱/۱۶	۱۱/۳۳	۱۰/۵۷	۱۲/۵۸	۲۱/۵۵	۱۲/۳۰	۱۲/۹۴	۱۰/۸۳	۲۰/۴۰	۱۶/۸۱	۳۰/۳۷
	MIC : ۱/۳۲	۱۷/۰۷	۱۵/۷۱	۱۴/۵۲	۲۳/۳۹	۱۴/۹۰	۱۷/۶۶	۲۰/۲۴	۲۸/۷۲	۲۳/۲۶	۳۴/۰۳
استافیلوکوکوس اورئوس	MIC : ۱/۲	۰/۹۴	۱/۲۸	۰/۶۱	۱/۰۵	−۰/۲۰	۰/۸۵	−۱/۲۷	−۰/۴۷	−۰/۶۹	۰/۱۱
	MIC : ۱/۴	۱/۴۱	۴/۲۳	۳/۵۵	۶/۳۴	۵/۱۶	۲/۶۱	۲/۱۱	۳/۵۰	۵/۶۹	۳/۳۹
	MIC : ۱/۸	۳/۷۶	۸/۹۳	۸/۵۱	۸/۷۸	۸/۱۵	۱۱/۲۴	۵/۹۱	۶/۳۶	۸/۹۲	۵۶/۶۸
	MIC : ۱/۱۶	۴/۹۸	۱۳/۹۹	۱۵/۱۸	۱۶/۹۴	۱۷/۳۳	۲۰/۰۷	۷/۴۸	۱۱/۳۹	۱۱/۵۸	۲۳/۵۲
	MIC : ۱/۳۲	۷/۸۱	۲۲/۵۴	۲۰/۵۵	۱۹/۵۵	۳۹/۹۹	۲۴/۱۰	۱۳/۷۱	۱۳/۷۳	۱۴/۱۷	۲۷/۱۳
سودوموناس آئروژینوزا	MIC : ۱/۲	۰/۱۷	۰/۱۷	۰/۰۰	۰/۰۷	−۰/۳۶	−۰/۶۱	−۰/۵۹	۰/۵۹	۰/۱۹	۰/۳۹
	MIC : ۱/۴	۸/۸۴	۵/۵۲	۱/۲۱	۱/۱۲	۷/۰۹	۴/۱۷	۸/۰۳	۵/۸۵	۵/۶۰	۴/۱۱
	MIC: ۱/۸	۱۲/۲۰	۱۱/۶۲	۶/۲۸	۴/۵۸	۱۳/۱۱	۴/۷۳	۱۰/۵۵	۷/۹۰	۵/۸۵	۵/۲۴
	MIC : ۱/۱۶	۱۵/۲۶	۱۸/۷۲	۷/۸۹	۷/۲۷	۱۹/۹۴	۸/۶۹	۸/۸۳	۱۶/۱۳	۸/۴۱	۶/۵۵
	MIC : ۱/۳۲	۱۹/۰۸	۲۲/۲۴	۱۳/۱۰	۹/۶۹	۲۱/۰۳	۱۱/۷۱	۱۴/۹۸	۲۴/۷۲	۱۱/۸۸	۸/۲۲

بحث و نتیجه گیری

عفونت‌های بیمارستانی از علل شایع و مهم مرگ و میر و افزایش طول مدت بستری بیماران هستند (۱۲). *سودوموناس آئروژینوزا* و *اسینتوباکتر* بیش‌ترین عوامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی به ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه هستند که مقاومت وسیع آنتی‌بیوتیکی و توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند (۱۳).

بیوفیلم انتروکوک‌ها در طیف وسیعی از وسایل پزشکی که معمولاً بیماران بستری با آن در ارتباط هستند، یافت می‌شود و احتمالاً یکی از عوامل ابتلا به عفونت‌های بیمارستانی است (۱۴). توانایی تشکیل بیوفیلم در *استافیلوکوکوس‌ها* از عوامل مهم مزمن شدن عفونت‌های ناشی از این باکتری‌هاست که اهمیت زیادی در پزشکی و دامپزشکی دارد (۱۵).

برای تشخیص بیوفیلم، روش‌های مختلفی مانند میکروسکوپ الکترونی نگاره [۲۴] (نمونه‌های بالینی)، روش‌های هیبریدیزاسیون [۲۵] DNA و رنگ آمیزی اختصاصی ماتریکس و غیره وجود دارد (۱۶). در این بررسی که ابتدا قدرت تشکیل بیوفیلم در نمونه‌های باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اسینتوباکتر* و *انتروباکتر* به روش میکروتیتر پلیت انجام گرفت، همه جدایه‌ها بیوفیلم ایجاد کردند که کم‌ترین قدرت تشکیل بیوفیلم مربوط به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، و بیش‌ترین قدرت تشکیل بیوفیلم مربوط به باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بود. این میزان تشکیل بیوفیلم در مورد *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروباکتر* با نتایج سوماریا[۲۶] و همکارانش در سال ۲۰۱۲ مطابقت داشت (۱۷).

پژوهشگران به علت اهمیت بیوفیلم در ایجاد بیماری‌ها و مقاومت دارویی در جستجوی راه‌های مناسبی برای مهار و پیشگیری از تشکیل بیوفیلم هستند. که در این مورد می‌توان به استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف (۱۸)، شلاتور کننده‌های فلزی (۱۹)، مواد ضدباکتریایی مانند ان- استیل سیتوزین [۲۷] (۲۰)، عسل (۲۱)، کرم (۲۲)، و در نهایت، به مهار کننده‌های کویوروم سنسینگ [۲۸] (۱۶) و غیره اشاره کرد. در این پژوهش نیز به آثار ضد بیوفیلمی ماده ضدعفونی کننده کلرهگزیدین پرداخته شده است که یک ضدعفونی کننده با طیف اثر گسترده، ارزان و در دسترس است (۲۳). برای این کار میزان MIC کلرهگزیدن بر روی جدایه‌های مربوط به هر ۴ باکتری مورد مطالعه که بیوفیلم قوی و متوسط داشتند محاسبه شد. در این میان *اسینتوباکتر* کم‌ترین میزان MIC (۰/۰۰۰۳ گرم بر میلی‌لیتر) را به خود اختصاص داد. بقیه جدایه‌ها با میزان MIC کمتر از ۰/۰۰۱ بودند که با نتایج منگیستو[۲۹] و همکاران در سال ۱۹۹۹ (۲۴) و گرار[۳۰] و همکاران در سال ۲۰۱۰ مطابقت داشت (۲۵).

در مرحله تعیین میزان اثر کلرهگزیدین بر رشد پلانکتونی، که به شکل مرئی گزارش شد طبق تحلیل آماری داده‌ها، میانگین رشد پلانکتونی جدایه‌های مورد مطالعه در غلظت های MIC 2، MIC و MIC1:2 هیچ گونه رشدی وجود نداشت و از غلظت MIC1:4 به بعد، رشد هر چهار باکتری گزارش شد که از این نظر با نتایج ابراهیمی [۳۱] و همکاران در ۲۰۱۴ مطابقت داشت (۲۶). همچنین، در مطالعه‌ای که توسط هندیانی [۳۲] و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت از ۷۴ جدایه بالینی *اسینتوباکتر بومانی*[۳۳]، ۱۳ درصد (۱۰ مورد) بیوفیلم قوی ایجاد کردند (۲۷) که در مقایسه با نتایج پژوهش حاضر (۴۶ درصد) میزان پایینی است که احتمالاً مربوط به اختلاف در گونه باکتری و شرایط محیطی می‌باشد. در

این پژوهش می‌توان گفت که برای مهار رشد هر چهار باکتری یاد شده به غلظتی بالاتر از MIC نیازی نبود و این غلظت از کلرهگزیدین، در مهار رشد باکتری‌های یاد شده به شکل مؤثری عمل کرد.

برای کنترل بیوفیلم باکتریایی، بایستی MIC مواد ضدباکتریایی علاوه بر روی حالت پلانکتونیک، بر روی بیوفیلم حاصله نیز بررسی شود زیرا ممکن است میزان MIC برای یک باکتری در حالت بیوفیلمی تا ۱۰۰ برابر بیشتر از حالت پلانکتونی باشد (۲۸). در پژوهش حاضر نیز اثر کلرهگزیدین بر تشکیل بیوفیلم در هر کدام از چهار باکتری یاد شده انجام شد و نتایج نشان داد که درصد افزایش OD در مرحله رشد بیوفیلمی بیشتراز مرحله رشد پلانکتونی است که این ناشی از مقاومت بالای باکتری در این مرحله می‌باشد. علت مقاومت می‌تواند ناشی از ایجاد فنوتیپ تطبیقی (۱۹)، وجود ساختار گلیکوکالیکس در اطراف سلول‌های بیوفیلم و قدرت چسبندگی سلول‌های بیوفیلم (۲۹)، انتقال ژن‌های مقاومتی در بین سویه‌ها و نیز در بین باکتری‌های مختلف (۳۰)، بیان ژن‌های مقاومتی مختلف (۳۱)، کاهش متابولیسم و آهسته شدن رشد (۳۲) در حالت بیوفیلم باشد.

در رابطه با این مورد، در پژوهشی که تاکنو[۳۴] و همکاران در سال ۱۹۹۴ تحت عنوان اثر ضدعفونی کننده‌ی کلرهگزیدین روی بیوفیلم و رشد پلانکتونی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* انجام دادند، نتایج بدست آمده نشان داد که بیوفیلم دارای مقاومت بیشتری نسبت به سلول‌های پلانکتونی است (۳۳). هوی کانگ[۳۵] و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که اثر ضدعفونی کننده کلرهگزیدین بر روی رشد پلانکتونی *انتروباکتر* بیشتر از بیوفیلم آن است (۳۴).

در پایان، می‌توان نتیجه گیری کرد که استفاده از ضدعفونی کننده‌ها (کلرهگزیدین) در غلظت‌های مناسب می‌تواند از رشد و توسعه گونه‌های مختلف باکتریایی جلوگیری کند اما دوزهایی از ضدعفونی کننده که کم تر از MIC هستند می‌توانند محرک تولید بیوفیلم باشند. در نهایت، می‌توان گفت که درمان بیوفیلم هنوز یکی از مشکلات مهم بشر به حساب می‌آید و نیاز پژوهش و مطالعه بیشتری در این زمینه وجود دارد. با در نظر گرفتن اینکه از بین بردن بیوفیلم‌ها پس از تشکیل، کار سخت و طاقت فرساست بهتر است از تشکیل بیوفیلم جلوگیری شود.

References

(1) Ernst R.K., Adams K.N., Moskowits S.M., Kraig G.M., Kavasaki K., Stead C.M. The *Pseudomonas aeruginosa* lipid A deacylase: selection for expression and loss within the cystic fibrosis airway. *Journal of Bacteriology* 2006; 188 (1): 191- 201.

(2) Schaberg D.R., Culver D.H., Gaynes R.P. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *American Journal of Medicine* 1991; 91 (3): 72- 75.

(3) Levin A.S., Barone A.A., Penço J., Santos M.V., Marinho J.S., Arruda E.A., et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Infectious Diseases* 1999; 28 (5): 1008- 11.

(4) Yousefi Mashouf R., Nazari M., Shams M. Evaluation of efficacy of the current disinfectants on *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals of Hamadan in 2006. *Tabib_e_shargh* 2007; 8 (1): 287- 96.

(5) Manau-Navarro C., Guasch-Serra S. Métodos de control de placa bacteriana. In: Cuenca E., Manau C., Serra L.L. *Odontología Preventiva y Comunitaria: Principios Métodos y Aplicaciones*. 2nd. ed. Barcelona: Masson; 2003: 69- 88.

(6) Barthel CR., Zimmer S., Zilliges S., Schiller R., Göbel U.B., Roulet J.F. In situ antimicrobial effectiveness of chlorhexidine and calcium hydroxide: gel and paste versus gutta-percha points. *Journal of Endodontics* 2002; 28 (6): 427- 30.

(7) Wolf G., Crespo J.G. Optical and Spectroscopic method for biofilm examination and monitoring. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 2002; 1 (3): 227- 51.

(8) Nowroozi J. *General Bacteriology*. 1st. ed. Tehran: Jafari Publications; 2011.

(9) Jenkins S., Addy M., Wade W. The mechanism of action of chlorhexidine. *Journal of Clinical Periodontology* 1988; 15 (7): 415- 24.

(10) Mahbad A., Mohamadi M., Hamidi Fard M. *Practical techniques for the laboratory diagnosis of bacterial and virology*. 3rd ed. Tehran: Ketab Mir; 2007.

(11) Tendolkar P.M., Baghdayan A.S., Gilmore MS. Enterococcal surface protein: Esp Enhances biofilm formation *by Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity* 2004; 72 (10): 6032- 9.

(12) Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45 (4): 999-1007.

(13) Delissalde F., Amábile-Cuevas CF. Comparison of antibiotic susceptibility and plasmid content, between biofilm producing and non-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2004; 24 (4): 405- 08.

(14) Kristich C.J., Li Y.H., Cvitkovitch D.G., Dunny G.M. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology* 2004; 186 (1): 154- 63.

(15) Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell DE., Korber DR., Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annual Review* of *Microbiology* 1995; 49 (1): 711- 45.

(16) Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2010; 35 (4): 322- 32.

(17) Sharma V., Nainan M.T., Shivanna V. The effect of cavity disinfectants on the sealing ability of dentin bonding system: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry* 2009; 12 (3):109- 13.

(18) Mulla Summaiya A. Assessment of biofilm formation by the causative organisms of ventilator associated pneumonia at intensive care unit of a tertiary care hospital. *National Journal* of *Medical Research* 2012; 2 (1): 15- 8.

(19) Tre-Hardy M., Vanderbist F., Traore H., Devleeschouwer M.J. In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2008; 31 (4): 329- 36.

(20) Turakhia M.H., Cooksey K.E., Characklis W.G. Influence of calcium-specific chelant on biofilm removal. *Applied and Environmental Microbiology* 1983; 46 (5): 1236- 8.

(21) Roberts M.E., Stewart P.S. Modeling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology* 2005; 151: 75- 80.

(22) Dunford C., Cooper R., Molan P., White R. The use of honey in wound management. *Nursing Standard* 2000; 15 (11): 63- 8.

(23) Van der Plas M.J., Jukema G.N., Wai S.W., Dogterom-Ballering H.C., Lagendijk E.L., Van Gulpen C., et al. Maggot excretions/secretions are differentially

effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; 61 (1): 117- 22.

(24) Mengistu Y., Erge W., Bellete B. In vitro susceptibility of gram-negative bacterial isolates to chlorhexidine gluconate. *East African Medical Journal* 2009; 76 (5): 243- 6.

(25) Grare M., Dibama H.M., Lafosse S., Ribon A., Mourer M., Regnouf-de-Vains JB., et al. Cationic compounds with activity against multidrug-resistant bacteria: interest of a new compound compared with two older antiseptics, hexamidine and chlorhexidine. *Clinical Microbiology* 2010; 16 (5): 432- 38.

(26) Ebrahimi A., Hemati M., Dehkordi SH., Bahadoran S., Khoshnood S., Khubani S., et al. Chlorhexidine Digluconate Effects on Planktonic Growth and Biofilm Formation in Some Field Isolates of Animal Bacterial Pathogens. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 2014; 9 (2): e14298.

(27) Hendiani S., Abdi-Ali A., Mohammadi P. Comparison of two methods for quantification of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Biological Journal of Microorganism* 2014; 2 (8): 51- 8.

(28) Sandoe JA., Wysome J., West A.P. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006; 57 (4):767- 70.

(29) Brown M.L., Aldrich H.C., Gauthier J.J. Relationship between glycocalyx and povidone-iodine resistance in *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) biofilms *Applied and Environmental Microbiology* 1998; 1 (1995): 187- 93.

(30) Vu B., Chen M., Crawford R.J., Ivanova EP. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 2009; 14 (7): 2535- 54.

(31) Dibdin G.H., Assinder S.J., Nichols W.W., Lambert P.A. Mathematical model of β-lactam penetration into a biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* while undergoing simultaneous inactivation by released β-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1996; 38 (5): 757- 69.

(32) Keren I., Kaldalu N., Spoering A., Wang Y., Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS microbiology letters* 2004; 230 (1): 13- 18.

(33) Takeo Y., Oie S., Kamiya A., Konishi H., Nakazawa T. Efficacy of disinfectants against biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbios* 1993; 79 (318): 19- 26.

(34) Hoikynung K., Ryu J.H., Beuchat L.R. Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension dride on the surface of stainless steel and in a biofilm. *Applied and environmental microbiology* 2007; 73 (4): 1256- 65.

---

[1]- *Escherichia Coli*
[2]- *Staphylococcus aureus*
[3]- *Pseudomonas aeruginosa*
[4]- Cystic Fibrosis
[5]- Chlorhexidine
[6]- Chlorhexidine diacetate
[7]- Chlorhexidine digluconate
[8]- Antibacterial
[9]- Mono culture
[10]- Multi culture
[11]- minimum inhibitory concentration
[12]- *Acinetobacter*
[13]- *Enterobacter*
[14]- Tendolkar
[15]- Phosphate buffered saline
[16]- Crystal violet
[17]- Tryptic Soy Broth
[18]- McFarland
[19]- Optical density
[20]- Elisa Reader
[21]- Excel
[22]- Duncan
[23]- Optical Density Control
[24]- Scanning electron microscope
[25]- DNA Hybridization
[26]- Summaiya
[27]- N - acetyl cytosine
[28]- Quorum sensing
[29]- Mengistu
[30]- Grare
[31]- Ebrahimi
[32]- Hendiani
[33]- *A. baumannii*
[34]- Takeno
[35]- Hoikyung

Chlorhexidine effect on bacterial biofilms isoleated from nosocomial infections

Aziz alah Ebrahimikahrizsangi
Assistant Professor of Pathoniology, Shahrekord university, Shahrekord, Iran, a_karizsangi@yahoo.com
Ziba Shabanpour
M.Sc. of Bacteriology, Shahrekord university, Shahrekord, Iran, z_sh1388@yaho.com
Saeed Habibian
Associate Professor of Pathoniology, Shahrekord university, Shahrekord, Iran, habibian@vet.sku.ac.ir
Reza Hakimi alni *
Ph.D. Student of Bacteriology, University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran, r.hakimi91@basu.ac.ir
Majid Hemati
M.Sc. of Bacteriology, Shahrekord university, Shahrekord, Iran, m_hemati1@yahoo.com
Fatemeh Aflakiyan
M.Sc. of Bacteriology, Shahrekord university, Shahrekord, Iran, fatemeh_aflakiyan@yahoo.com
Mahdi dokhtefaraj
M.Sc. of Bacteriology, Shahrekord university, Shahrekord, Iran, shervindokhtfaraj@yahoo.com

Abstract

Introduction: Biofilms are population of bacteria cells that cause irreversible binding to the surfaces by producing extracellular polymers. Biofilm formation in bacteria causes resistance to antimicrobial agents and can lead to severe problems in this ground.

Materials and methods: The purpose of this study was to evaluate biofilm formation in some isolates of *Pseudomonas aeruginosa* (13 case), *Staphylococcus aureus* (13 case), *Enterobacter* (13 case) and *Acinetobacter* (13 case) which were collected from human infections of Alzahra hospital in Isfahan. Also the minimum inhibitory concentration of chlorhexidine and its impact on the growth of planktonic and biofilm formation for these isolates were determined. Statistical analysis and graphing have been carried out by using SPSS software (version 20) and Excel.

Results: All isolates (52 isolates) have produced biofilm. The mean of MIC of chlorehexidine antiseptic for the *p.aeruginosa*, *S.aureus*, *Enterobacter* and *Acinetobacter* were 0/001, 0/00013, 0/001, 0/0003 g/ml respectively. Planktonic bacterial growth inhibition from *p.aeruginosa* and *Enterobacter* in 1/4 MIC and 1/8 MIC respectively was seen in 40 and 60 % cases. *Acinetobacter* and *Staphylobacter aureu*s, have been controlled in 40 % of cases in 1/4 MIC and 60 % of cases in 1/8 MIC. Biofilm has not been produced in any of MIC and 2MIC dilution, and the power of biofilm formation had been increased significantly by reducing concentration of chlorhexidine dilution.

Discussion and conclusion: The results indicate that the use of chlorhexidine in appropriate concentrations (MIC) can prevent bacterial growth and biofilm formation in different species causing hospital infections, but doses of chlorhexidine that are less than the MIC can stimulate biofilm formation.

Key words: Biofilm, Chlorhexidine, *Pseudomonas aeroginosa*, Staphylococcus areus, Enterobacter, Acinetobacter

* Corresponding author
Received: April 30, 2014 / **Accepted:** June 25, 2014