مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران
سال دوم ● شماره ۱ ● صفحات ۲۹۵ تا ۲۹۹ ● بهار ۱۳۸۳

مقاله تحقیقاتی

مطالعه تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزا با روش اصلاح شده پلیت میکروتیتر و میکروسکوپ الکترونی نگاره

مژگان محمدی مهر[۱]، *دکتر احیاء عبدی عالی[۲]

خلاصه:

سابقه و هدف :با توجه به مشکل درمان عفونت های بیوفیلم باکتریائی وعدم تشخیص بیوفیلم با روشهای مرسوم تشخیصی، این تحقیق با هدف ارائه روش شناسائی و تولید بیوفیلم توسط باکتریها، با مطالعه Pseudomonas aeruginosa بعنوان یکی از مهمترین باکتریهای تولید کننده بیوفیلم صورت گرفته است.

مواد وروشها:تحقیق از نوع تحقیقات پایه ای بر روی ۴۲ نمونه بالینی با استفاده از روش پلیت میکروتیتر اصلاح شده و مطالعه میکروسکوپ الکترونی نگاره انجام پذیرفت.

یافته ها:با روش انجام شده تولید بیوفیلم توسط سویه مورد بررسی بخوبی معین گردید وسویه ۲۱۴، با بیشترین میزان تولید بیوفیلم و جذب نوری جهت مطالعه میکروسکوپ الکترونی انتخاب گردید.

نتیجه گیری و توصیه ها:به نظر میرسد روش اصلاح شده پلیت میکروتیتر جهت استفاده تشخیصی در آزمایشگاههای تشخیصی راحت تر ومقرون به صرفه باشد با توجه به مشکلات درمانی بیوفیلم باکتریایی توصیه می شود قبل از تجویز آنتی بیوتیک تولید بیوفیلم توسط سویه مورد بررسی مطالعه گردد.

کلمات کلیدی: بیوفیلم، Pseudomonas aeruginosa ، مقاومت آنتی بیوتیکی.

مقدمه:

Pseudomonas aeruginosa باکتری گرم منفی ،متحرک،هوازی، میله ای شکل قادر به رشد در اغلب محیط های زنده عمدتا آب وخاک است .این باکتری یکی از مهمترین عوامل بیماریزای فرصت طلب است واغلب در عفونت های بیمارستانی یافت می شود. مسئول ۱۶٪موارد پنومونیه بیمارستانی(۱)،۱۲٪عفونت های دستگاه ادراری اکتسابی بیمارستان (۲)،۸٪عفونت های زخم های جراحی(۳)و ۱۰٪ عفونت های خونی است. بیماران با نقص سیستم ایمنی و سرطان و بیماران سیستیک فیبروزیس (Cystic fibrosis) به طور ویژه ای به عفونت های ایجاد شده توسط این باکتری حساس هستندو در بیماران سیستیک‌فیبروزیس‌تهدید کننده زندگی است.(۴)در این گروه بیماران P.aeruginosa مسئول پنومونیه و سپتی سمی با میزان مرگ ومیر ۳۰٪ است.(۵ و۶)این باکتری به دلیل تولید بیوفیلم[1]به درمان آنتی بیوتیکی و دفاع سیستم ایمنی بدن مقاوم است(۷،۱۰)

بیوفیلم باکتریایی، جامعه ای از باکتریهای چسبیده ورشدکننده بر سطوح جاندار یا بی جان محصور در یک ماتریکس پلی ساکاریدی می باشد(۸،۷)

بیوفیلم باکتریها را می توان در نواحی مختلف بدن از جمله غشاهای مخاطی، دندان، ابزار پزشکی کاشتنی (سوند ،پروتزها ..)جستجو کرد.(۷)

تشخیص بیوفیلم ها به روش متداول کشت در آزمایشگاه میسر نمی‌باشدو از آنجایی که بیوفیلم ها مسئول ۶۰٪ از عفونت انسانی

۱- کارشناس ارشد میکروب شناسی و پژوهشگردانشگاه علوم پزشکی ارتش- دانشکده پزشکی
۲-استادیار عضو هیئت علمی گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه الزهراء (* نویسنده مسئول)

1- Biofilm

هستند،(۸) شناسائی عفونت های بیوفیلم حائز اهمیت می باشد. مطالعه بیوفیلم به روشهای مختلفی انجام می گردد. اغلب از روش تست های لوله ای و پلیت میکروتیتر[1] که در مقایسه با تست لوله ای دقت بالاتری دارد استفاده می گردد در این روش اتصال باکتریها به کف و دیواره چاهک وتولید بیوفیلم با میزان رنگ پیوند شده وجذب نوری تعیین می گردد.در مطالعه میکروسکوپ الکترونی، اجتماع باکتریهای چسبیده به سطح که تولید میکروکلنی (Microcolony) و بدنبال آن بیوفیلم را می‌نمایند مشاهده می شود.

مواد و روشها:

در این مطالعه که از نوع تحقیقات پایه ای است از ۴۲ سویه P.aeruginosa جمع آوری شده از بیمارستان استفاده شد. ابتدا آزمایشهای تشخیصی شامل رنگ آمیزی گرم ،تست کاتالاز واکسیداز ،تست های بیوشیمیائی(SIM.TSI.Acetamid,P.ager.MRVP) بر روی نمونه ها انجام گردید و سویه هایی که کلنی موکوئیدی بر روی محیط TSA تولید کردند پس از تخلیص به محیط اسکیم میلک (skim milk) منتقل ودر ۲۰- درجه نگهداری شدند.

مطالعه با پلیت میکرو تیتر :

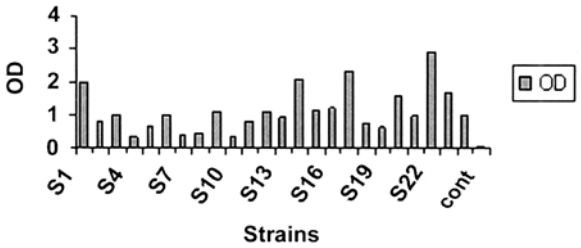
روش اصلاح شده پلیت میکرو تیتر Stepanovic برای تعیین قدرت تشکیل بیوفیلم توسط سویه ها مورد استفاده قرار گرفت .(۱۱) در این روش ۲۴ سویهٔ، موکوئیدی جمع آوری شده از اسکیم میلک به محیط کلمبیا آگار منتقل ، و یک شبانه روز در دمای ۳۷ °C گرماگذاری شدند. سپس نمونه ها به محیط TSA تکمیل شده با ۰/۲٪ گلوکز منتقل و در شرایط هوازی در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری (incubation) شدند. سپس تک کلنی‌ها به محیط TSB تکمیل شده با ۰/۲٪ گلوکز منتقل و جذب نوری معادل ۰/۱٪ در طول موج ۶۵۰ تنظیم گردید و به میزان ۱۰۰µl از هر نمونه به ۶ چاهک موازی در پلیت میکروتیتر ۹۶ چاهکی افزوده شدواز محیط TSB تنها به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۳۷ °C محتوی چاهک ها به آرامی آسپیره وبا بافر (۰/۰۱مولار بافر فسفات پتاسیم ایزوتونیک با سالین pH=۷/۵) شسته شده سپس ۱۵۰µl متانول (Methanol) خالص به چاهک اضافه ، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق جهت تثبیت سلولهای متصل به کف و جدار چاهک نگهداری شده اند ودرمرحله بعد پس از آسپیره متانول، هرچاهک با ۲۰۰µl کریستال ویوله W/V ۱٪ مدت ۲۰ دقیقه گرماگذاری و پلیت به آرامی جهت حذف اضافه رنگ با آب شیر شسته شد بعد از خشک شدن در مجاورت هوا ،هر چاهک با ۱۶۰µl اسید استیک گلاسیال V/V ۳۳٪ مجاور گردید وبا طول موج (۵۷۰)نانومتر توسط READER ELISA جذب هر چاهک خوانده شد.(آزمایش ۳ بار تکرار گردید)

مطالعه با میکروسکوپ الکترونی

در این مطالعه سویه ۲۱۴ با بیشترین میزان جذب در مرحله قبل انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت وتولید بیوفیلم باکتری بر سطح صفحه تفلون وسوند با تغییراتی در روش ISHIDA تثبیت شده و با میکروسکوپ الکترونی نگاره مورد مطالعه قرار گرفت(۹). ابتدا باکتری مورد نظر به محیط TSA (دارای ۵٪ گلوکز) تلقیح و به مدت ۱۶-۲۰ ساعت در ۳۷ °C گرماگذاری وپس از انتقال به محیط TSB (۵٪گلوکز) و مقایسه با ۰/۵ مک فارلند به غلظت 10^6 cfu/ml تنظیم و پس از افزودن صفحات تفلون (۱×۱×۰/۳)سانتیمتر و قطعات سوند به ابعاد ۱/۵سانتیمتر تعدادی را به مدت یک روز وتعدادی را به مدت هفت روز گرماگذاری می‌شد. بعد از این زمان قطعات سوند وتفلون را با بافر فسفات سالین سه بار شسته و در گلوتار آلدئید ۲/۵٪ در بافر فسفات ۰/۱۵مولار با pH= ۷/۳ به مدت یک ساعت تثبیت و پس از شستن با بافر فسفات در محلول اسید تانیک ۱ W/V٪ در بافر فسفات یک ساعت گرماگذاری ومجدد بابافر فسفات شسته و جهت آبگیری در رقت های ۲۵٪، ۵۰٪، ۷۰٪، ۹۰٪، ۱۰۰٪ اتانول به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه (سه بار) مجاور شد و بعد از خشک شدن در مجاورت هوا به فریزر ۷۰ °C- منتقل وبعد از ۲۴ ساعت با دستگاه فریزر Drier خشک شده و با طلا coat شده با میکروسکوپ الکترونی نگاره مطالعه گردید.

یافته ها:

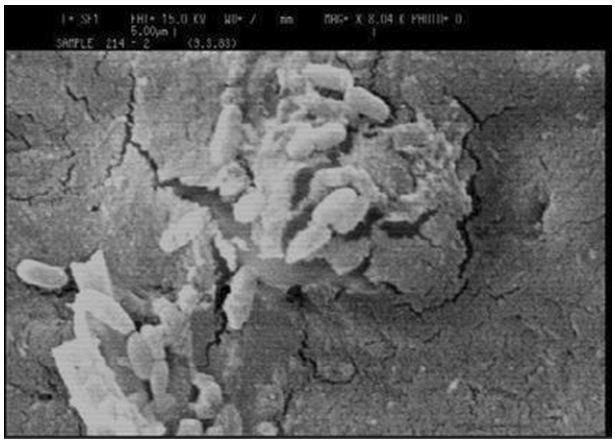
تولید بیو فیلم در پلیت میکروتیتر توسط سویه ها در مقایسه با کنترل (شاهد منفی) نشان داد سویه ۲۱۴ با میزان جذب نوری ۲/۸۹ بیشترین میزان تولید بیوفیلم را دارا می باشد.(نمودار۱)



(نمودار۱) s_{22} سویه ۲۱۴

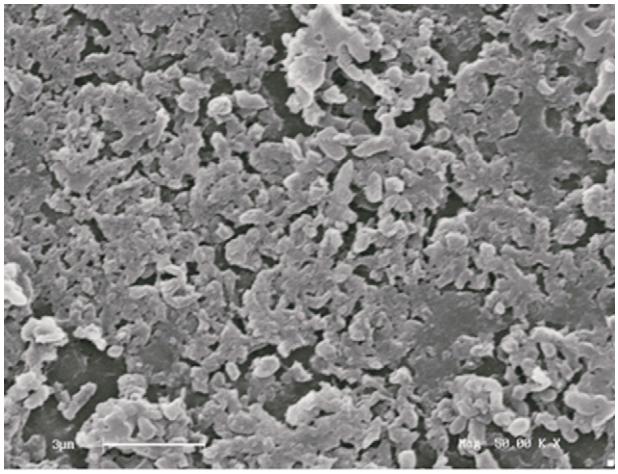
1- Plate Microtitre

نتیجه مطالعه با میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد که ضخامت بیوفیلم تولید شده پس از ۷ روزگرماگذاری در مقایسه با بیوفیلم ۱ روزه بیشتر بوده علاوه بر آن میزان تشکیل بیوفیلم بر سطح سوند از صفحه تفلون بیشتر بود . (اشکال ۵-۱)

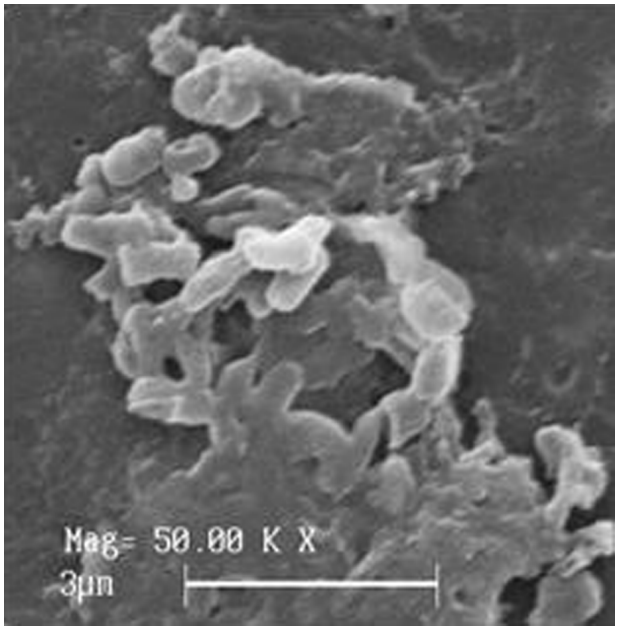


شکل ۱

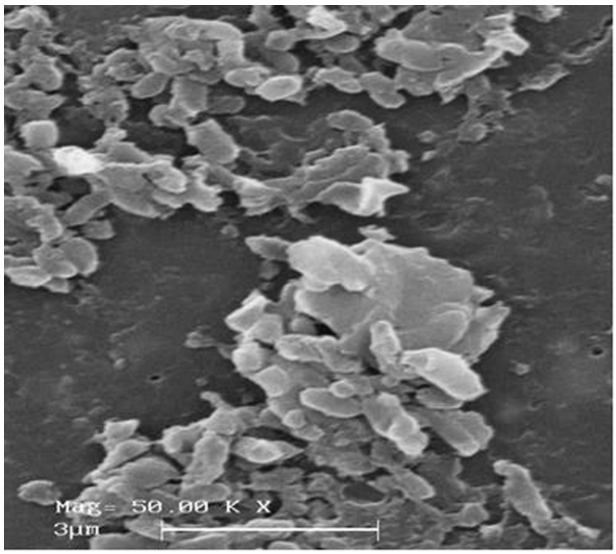
شکل ۲



شکل ۳



شکل ۴



شکل ۵

شکل۱ :بیوفیلم یک روزه بر سطح سوند
شکل۲ : بیوفیلم یک روزه بر سطح تفلون
شکل۴ : بیوفیلم هفت روزه بر سطح تفلون
شکل۳ و۵: بیوفیلم هفت روزه بر سطح سوند

بحث و نتیجه گیری:

در طبیعت میکرو ارگانیسم ها اغلب در ارتباط نزدیکی با سطوح جامد رشد می کنند که این سطوح ممکن است بافت های نرم زنده ویا سطوح غیر زنده ،مواد غوطه ور ویا ذرات خاک باشد.(۱۲،۱۳) ارتباط و پیوستگی با سطوح جامد منجر به تشکیل بیوفیلم میکروبی می گردد. تشکیل بیوفیلم منافع زیادی برای ارگانیسم متشکله دارد از جمله حفاظت آنها در برابر سیستم ایمنی میزبان ، مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها وضد عفونی کننده ها ، حفظ ونگهداری محیط فیزیکی شیمیایی مناسب برای رشد و بقاء میکروارگانیسم (۱۴)؛ بنابر این آنها قادرند در شرایط نامساعد محیطی مقاومت کرده وبه حیات خود ادامه دهند. یکی از مهمترین پیشرفت ها در پزشکی مدرن استفاده از وسایل ساخته شده در پیوند دهی موقت ودائم است. امروزه دربیشتر درمان های پزشکی وجراحی از سوندها ولوله ها وابزار پزشکی کاشتنی استفاده می گردد مهمترین مشکل استفاده از این وسایل ایجادعفونت بیوفیلم میکروبی است.بیوفیلم‌ها در عفونت بافت آندوکاردیت،عفونت نازوفارنکس،عفونت دندان ولثه وعفونت با ابزار پزشکی کاشتنی مثل سوند وپروتز ها یافت می شوند.بیمارانی که احتیاج به سوند گذاری طولانی مدت دارند به طیف وسیعی از میکرو ارگانیسمها از جمله سویه های مقاوم آنتی بیوتیک P.aeruginosa مولد بیوفیلم ،انتروباکتر (Enterobacter)، پروتئوس (Proteus) مبتلا می گردند. Nickle وهمکارانش (۱۵) تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزا را بر سطح سوند با مطالعه میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان دادند.

با توجه به مقاومت آنتی بیوتیکی بیوفیلم باکتریها نسبت به حالت پلانکتونیک، این مسئله اهمیت بررسی وتشخیص بیوفیلم در عفونت ایجاد شده و لحاظ این مسئله را در درمان نشان می دهد. جهت سنجش تعدادوچگونگی توزیع باکتریهای چسبیده به سطح می توان از میکروسکوپ الکترونی استفاده کرد.

در مطالعه با کمک میکروسکوپ الکترونی نگاره ،امکان مشاهده باکتریهای چسبیده به طیف وسیعی از تکیه گاهها را مانند فلزات، بافتهای گیاهی وجانوری و سوند فراهم می گردد. بنابر این اغلب به طور وسیعی به کار می رود.

شمارش باکتریها ومشاهده مرفولوژی آنها ،تعیین خصوصیات توپوگرافی سطح و مشاهده ارتباطات توزیعی بین باکتریها وتکیه گاه‌را امکان پذیر می سازد.از معایب این مطالعه کوچکی زمینه ،زمان طولانی جهت آماده سازی نمونه واز بین رفتن پلیمرها ودنباله ها طی فرایند آماده سازی است .(۱۹-۱۶)

در بررسی کیفی تشکیل بیوفیلم از روش های تست لوله ای و پلیت میکروتیتر استفاده می گردد.در این تحقیق پلیت ۹۶ چاهکی پلی استرن استفاده شد که مزیت آن ایجاد سوبسترای استاندارد جهت اتصال باکتریها است. این روش وابسته به دانسیته نوری سلولهای باکتریایی چسبیده است و بنابراین در زمانی که تراکم باکتریایی روی سطح کم باشد غیر حساس است جهت اصلاح این عیب از اسید استیک در مرحله پایانی استفاده شد.(۱۱)

در این روش با افزودن اسید استیک گلاسیال قادر به اندازه گیری غیر مستقیم‌باکتریهای 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 چسبیده‌به دیواره حل می کند وباعث دقت در تعیین میزان بیوفیلم ایجاد شده‌می گردد تست پلیت میکروتیتر اصلاح شده یک سنجش کمی مناسب جهت بررسی تولید بیوفیلم است.

در توافق با نتایج Stepanovic و بررسیهای انجام شده توسط Susanne و همکارانش (۱۰،۱۱) افزایش میزان تولید بیوفیلم وجذب نوری رابطه مستقیم دارد.و سویه ۲۱۴ که نسبت به دیگر سویه های بررسی شده کلنی های موکوئیدتر بر سطح پلیت تولید کرده بود بیوفیلم ضخیم تری ایجاد نمود.این مسئله در تائید رابطه کلنی موکوئید و ایجاد بیوفیلم بیشتر می باشد.

در مطالعه میکروسکوپ الکترونی هم نتایج بدست آمده با نتایج Ishida وهمکارانش (۹)توافق دارد و ضخامت وساختار بیوفیلم ۷روزه از بیوفیلم ۱روزه بیشترواجتماع میکروکلنی ها را به همراه دارد همچنین بیوفیلم تولید شده برسطح سوند درمقایسه باتفلون ساختار ضخیم‌تر وبزرگتری را نشان داد که بیانگر مناسب بودن سطح سوند به عنوان سوبسترای مناسب جهت اتصال پایدار و تشکیل بیوفیلم است.

REFERENCES:

1. Wiblin RT.Nosocomial pneumonia .InWenzel RP, editor. Prevention and control of nosocomial infection. 3rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins: 1997.p.807-819.

2. Pollack M. Pseudomonas aeruginosa. In: Mandell GL, infectious diseases 4th ed. New York: Churchill Livingstone; 1980-2003.

3. Kluytman J. Surgical infections including burns. In: Wenzel RP, editor. Prevention and control of nosocomial infections. 3rd ed. Baltimore; Williams and Wilkins; 1997.p.841-865.

4. Christian van Delden, Barbara H. Iglewski.Cell-to-Cell Signaling and Pseudomonas aeruginosa Infections. Emerging Infectious Disease1998: 4(4): 551-560.

5. Fergie JE, Shema SJ, Lott L, Crawford R, Patrick CC. Pseudomonas aeruginosa bacteremia in immunocompromised children: analysis of factors associated with a poor outcome. Clin Infect Dis 1994: 18;390-394.

6. Bergen GA, Shelhamer jH. Plumonary infiltrates in the cancer patient. Infect Dis Clin North Am1996; 10:297-326.

7. Alexei, Brooun; Songhua, Liu; Kim, Leiws. A Dose –Response study of Antibiotic Resistatance in Pseudomonas aeruginosa Biofilms. Antimicrobial Agent Chemotherapy 2000: 640-646.

8. Amyl; Spoering; Kim, Lewis. Biofilm and planktonic cells of pseudomonas aeruginosa have similar Resistance to Killing by Antimicrobials. journal of Bacteriology. 2001: 6746-6751.

9. Hiroko, Ishida; Yoshihisa ishida; Yuichikurosaka. In vitro and In vivo Activities of Levofloxacin against Biofilm producing pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agent Chemotherapy. 1998; 92(7); 1641-1645.

10. Susanne, Haubler; Isabell, Ziegler; Alexander, Lottel. Highly adherent small-colony variants of pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis lung infection. journal of Medical Microbiology. 2003; 52; 295 -301.

11. Srdjan, Stepanovic; Dragana, Vukovic; Fuana, Dakic. A modified microtiter-playe test for quantification of staphylococcal biofilm formation. journal of Microbiological Method. 2000; 40; 175-179.

12. Costerton, j.w,k.j. cheng, G.G.Geesey. Bacterial biofilm in nature and disease. Ann. Rev. Microbiol. 1987: 41; 435-464.

12. Dunn, I.j. Method for selecting and growing mixed culther in biofilm fludized sand beds. methods in Enzymology.1987; 135: 300-307.

13. Brown, M.R>W, P. Gilbert. sensivity of biofilms to antimicrobial agents. J.Appl. Bacteriol. 1998; 74: 87-97.

14. Nickle, J.C.A. Downey. J.W. Costerton. Ultrastructural Study of an infected foley catheter. The Can. J. surgery. 1985; 28: 50-51.

15. Christensen, G.D., L, Balda ssarri, W.A. simpsom. Method for study microbial colonization of plastics. Method. Enzymol. 1995; 253: 477-500.

16. Fletcher, M. Method for studying adhesion and attachment to surface. Method. Microbial.19990; 22: 251-281.

17. Surman, S.B. Compartion of microscopic techniques for the enamination of biofilms. J.Microbiol. Method. 1996; 25: 57-70.

18. Yueluei, H., R. Friedman. labratory methods for studies of bacterial adhesion. J. Microbiol. Method. 1997; 30: 141-152.

19. Srdjan, Stepanovic; Dragana, Vukovic; Fuana, Dakic. A modified microtiter-playe test for quantification of staphylococcal biofilm formation. journal of Microbiological Method. 2000; 40; 175-179.

Study of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* using modified microtitre plate and scanning electron microscope

*Mojgan Mohammadi-Mehr[1], Ahya Abdi Ali[2]

Abstract :

Background: in this study, using a modified microtitre plate and scanning electron microscope, we investigated biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* .biofilm productions are difficult to eradicate with antimicrobial treatment and up to 60% of all human infections are caused by biofilms. Bacterial biofilms may be found at various sites, including mucus membrane, teeth and indwelling medical devices. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important opportunistic bacteria and producing biofilm. It has been reported that biofilm forming bacteria are more resistance to antibiotic treatment and immunologic attack.

Materials and methods: clinical isolates of *P.aeruginosa* were collected from hospital and identified by biochemical tests. A modified microtitre plate as described by stepanovic was used to determine the biofilm formation capacity of *P.aeruginosa* and measured using ELISA reader. The bacteria biofilm on the Teflon sheets and cather were fixed by modified method described by Ishila. They were observed with scanning electron microscope.

Results : the results demonstrated that *Pseudomonas aeruginosa* strain M214 denser biofilm formation compared with other strain, with OD=2.89 using modified microtitre plate test. Scanning electron micrograph of bacteria on the Teflon and catherter that had been incubated with *P.aeruginosa* M214 for 1 and 7 days were investigated. The results showed biofilm formation on catherter was denser that Teflon sheets. The bacteria incubated for 7 days on Teflon and catherter were covered with thick membranous and fibrous structure, unlike bacteria incubated for 1 day.

Conclusion: It seems modified microtitre plate is better and easier way to use in diagnostic labratories regard to treatment difficulteis, it strongly recommend to study the biofilm before antibiotic adminstration

Keyword: antibiotic resistance, biofilm, Pseudomonas aeruginosa .

1- (*corresponding author) M,Sc of microbiology, faculty of medical, Army university of medical science.
2- Asisstant professor of biology, faculty of basic sciences, Alzahra university.