

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

میترا صالحی¹، فروغ آبانگاه^{1*}، فرزانه حسینی¹

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

تاریخ پذیرش: 91/10/13

تاریخ دریافت: 91/3/3

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 میزان MIC، MBC و MBEC آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، جنتامایسین، تتراسایکلین و نیتروفورانثوئین 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 مجموع 93 درصد از ایزوله ها نسبت به نیتروفورانثوئین حساس بودند. بیشترین سلول های به ترتیب با نیتروفورانثوئین 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 عسکرداری با میکروسکوپ الکترونی تایید شد.

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

واژه های کلیدی: انتروکوک، پلانکتونیک، بیوفیلم، نیتروفورانثوئین

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

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 افزایش مقاومت های ذاتی و اکتسابی این باکتری و تولید بیوفیلیم است. (۱۷، ۲)

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، توانایی این باکتری جهت کلونیزه شدن در میزبان و تشکیل بیوفیلیم از دیگر ویژگی های آن در پایداری و انتشار عفونت در مراکز درمانی می باشد. (۸، ۷، ۶)

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 بیوفیلیم گزارش می شود، (۱۱، ۱۰، ۹). لایه آگزوپلی ساکاریدی از نفوذ مواد ضد میکروبی به درون بیوفیلیم جلوگیری می کند از این رو باکتری های شرکت کننده در بیوفیلیم، 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 بیوفیلیم 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 بیوفیلیمی 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 بیوفیلیم انتخاب و مقاومت آنتی بیوتیکی در شرایط بیوفیلیمی 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 مراکز درمانی 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).

برای این منظور سوسپانسیون میکروبی برابر با کدورت استاندارد 0/5 مک فارلند (غلظت تقریبی $108 \times 1/5$ CFU/ml) از باکتری های 16 ساعته (فاز رشد) تهیه گردید و از این سوسپانسیون میکروبی برای کشت در روی محیط مولر هیتتون 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، نیتروفورانئوئین، تتراسایکلین برای ادامه کار انتخاب شدند.

تعیین MIC و MBC 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 نیتروفورانئوئین به روش ماکرو برات 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 بر آن

جهت تهیه بیوفیلم، میزان 0/1 ml از سوسپانسیون باکتریایی سویه های حساس بالینی، با کدورت 0/5 مک فارلند به محیط BHI برات، 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 قرار گرفت. 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 μ l 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 پلیتی 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 بیوفیلم 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 گلو تارالدئید 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.

به پنی سیلین و کمترین نسبت به نیتروفوراتوئین در میان نمونه های مورد مطالعه دیده شد.

نتایج تعیین MIC و MBC

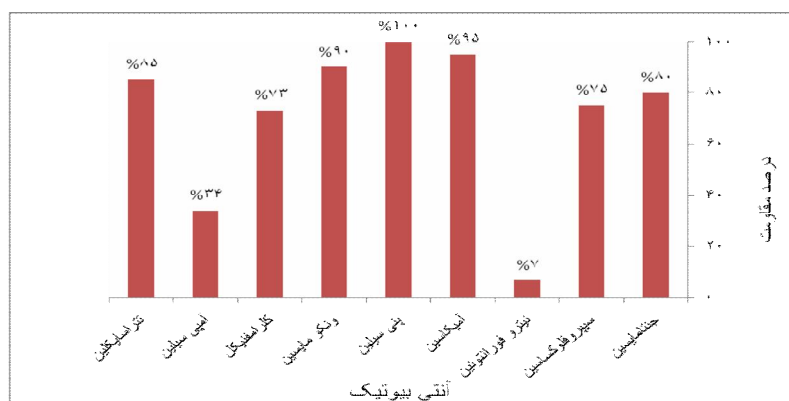
نتایج طیف کمترین غلظت های باکتریوسایدی و باکتریواستاتیک آنتی بیوتیک های جنتامایسین، نیتروفوراتوئین، آمپی سیلین و تتراسایکلین در سویه های مورد مطالعه در جدول شماره 1 آورده شده است. نتایج تاثیر باکتریسیدالی آنتی بیوتیک ها علیه بیوفیلم نتایج نشان داد که آنتی بیوتیک های جنتامایسین، آمپی سیلین، تتراسایکلین در از بین بردن سویه های حساس شرکت کننده در بیوفیلم 24 ساعته، کاملاً بی تاثیر بودند. آنتی بیوتیک نیتروفوراتوئین (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)

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 (16/6 درصد) 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، نیتروفوراتوئین 7 درصد، سیپروفلوکساسین 75 درصد، جنتامایسین 80 درصد بود. (نمودار شماره 1) بنا بر این بیشترین مقاومت نسبت



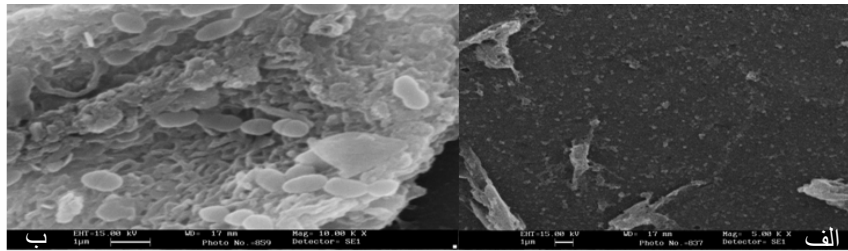
نمودار شماره 1. درصد مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های انتروکوک ایزوله شده از بیماران

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

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

جدول شماره 2. غلظت باکتریسیدالی نیتروفورانئوئین در روزهای مختلف

غلظت باکتریسیدالی	روز
256 $\mu\text{g/ml}$	اول
512 $\mu\text{g/ml}$	دوم
512 $\mu\text{g/ml}$	سوم
512 $\mu\text{g/ml}$	چهارم
1024 $\mu\text{g/ml}$	پنجم



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

بحث و نتیجه گیری

کم مقاومت به نیتروفورانئوئین، 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 ونکومايسين و حساسیت آن ها نسبت به نیتروفورانئوئین بود. (18) در تحقیق جانکوسکا در سال 2008 در بین ایزوله های انتروکوک مورد مطالعه، تمام سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک نیتروفورانئوئین حساس گزارش شدند در حالی که نسبت به آمپی سیلین، سیپروفلوکساسین و سفتریاکسون مقاومت نشان دادند. (19)

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

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). نیتروفورانئوئین یک آنتی بیوتیک باکتریواستاتیک و باکتریوسید برای بسیاری از ارگانيسم های گرم مثبت و گرم منفی است. مکانيسم دقیق اثر این آنتی بیوتیک کاملاً مشخص نیست و اثرات متفاوتی از تداخل در متابوليسم تا مهار پروتئین سازی را برای آن ذکر می کنند. با این حال نیتروفورانئوئین 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 نیتروفورانئوئین 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

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

از میان عوامل ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی، بیوفیلیم های باکتریائی سهم خاصی را به خود اختصاص داده اند. بر طبق گزارشات موسسه سلامت آمریکا (NIH) نقش بیوفیلیم در 80 درصد از عفونت های میکروبی گزارش می شود، (22). بیوفیلیم ایتروکوسی 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 بیوفیلیم یک فاکتور مهم در پاتوژن عفونت های ایتروکوک می باشد.

ریشه کنی بیوفیلیم نیاز به آنتی بیوتیک هایی دارد که بتوانند به طور مؤثر در ماتریکس بیوفیلیم 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 ارگانیزم یکسان در شکل پلانکتونیک باشد. بنا بر این امروزه میزان تاثیر غلظت های مختلف آنتی بیوتیک بر عفونت های بیوفیلیمی به عنوان روشی برای مطالعه جهت درمان عفونت های بیوفیلیم پیشنهاد شده است، (23). زیرا باکتری ها در حالت بیوفیلیمی 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 نیتروفوراتوئین، نشان داد که این آنتی بیوتیک ها بر عدم رشد سویه های ایتروکوک در شرایط پلانکتونیک تاثیر گذارند در صورتی که همین سویه ها در شرایط بیوفیلیمی نسبت به غلظت های بالای آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، تتراسایکلین و جنتامایسین مقاومت نشان می دهند. در مورد نیتروفوراتوئین، علاوه بر تاثیر آنتی بیوتیک (MIC: 32 µg/ml) بر عدم رشد باکتری در شرایط پلانکتونی، این دارو در شرایط بیوفیلیمی تا روز پنجم (MBEC ≤ 1024 µg/ml) کاملاً قدرت ریشه کنی سلول های ساختار بیوفیلیم را دارد.

در اکثر مطالعات سال های اخیر تاثیر نیتروفوراتوئین بر سلول های پلانکتونیک بررسی قرار

گرفته است. تحقیقات اندکی مبنی بر تاثیر نیتروفوراتوئین بر بیوفیلیم باکتریائی بررسی شده است. مطالعه مادئو شرما در سال 2009، نشان داد که نیتروفوراتوئین یکی از موثرترین آنتی بیوتیک ها، بر علیه سویه های E.coli به عنوان یکی از شاخص ترین باکتری های شرکت کننده در بیوفیلیم است، (25). نتایج تحقیق حاضر از لحاظ تاثیر آنتی بیوتیک در ریشه کنی بیوفیلیم ایتروکوک با پژوهش مادئو شرما هم خوانی دارد تنها تفاوت آن در نوع میکرو ارگانیزم مورد مطالعه می باشد، که در هر دو مطالعه تاثیر آنتی بیوتیک نیتروفوراتوئین بر بیوفیلیم نشان داده شده است در صورتی که تحقیقی مبنی بر تاثیر نیتروفوراتوئین در عدم رشد یا از بین بردن ساختار بیوفیلیم ایتروکوک 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 بیوفیلیم تثبیت شده با وجود استفاده از داروهایی که در تست حساسیت استاندارد در vitro بسیار فعالند، شکست می خورد. در مطالعه وست در سال 2006، مقایسه نتایج MBEC آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، ونکومایسین بر علیه بیوفیلیم ایتروکوکوس فکالیس با توجه به MIC و MBC نشان داد که MBEC آمپی سیلین و ونکومایسین 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 بیوفیلیم ها نیاز است، (26). گزارشات دیگر غیر موثر بودن ونکومایسین را در کشتن سلول های بیوفیلیم را نشان داده اند. (28، 27، 23)

چی و همکاران در سال 2007، بیوفیلیم ایتروکوکوس 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 بیوفیلیم این باکتری بودند ولی آمپی سیلین، کوتریموکسازول، ونکومایسین و ونکومایسین + جنتامایسین قادر نبودند که باکتری ها را به طور کامل در بیوفیلیم ریشه کن کنند. (29)

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 نیتروفوراتوئین 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 Dis* 1998;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, Rice L 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 News* 1999;21:57-65.
- 6-Creti R, Imperi M, Berruccini 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 Dis* 1999;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.

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.

- 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, Tenckhoff M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single Disk Method. *Am J Clin Pathol* 1996;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 aeruginosa* Biofilm by the modified method of microtiter plate and electron microscope]. *J Army Uni* 1383;259-99. (Persian)
- 16-Bockstael K, Van Aerscht A. Antimicrobial resistance in bacteria. *Central Eur J Med* 2009;4:141-55.
- 17-Rahbar M, Hajia M, Farzanekhan M. Activity of nitrofurantoin against urinary tract infection (UTI) isolates of vancomycin-

- 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. Nitrofurantoin 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.

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

Salehi M¹, Abangah F^{1*}, Hoseini F¹

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

Abstract

Introduction: Enterococci are the commensally 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, gentamicin, 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 hypurate 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)