

بیوفیلیم پseudomonas/ایروژینوزا و روش های پیشگیری و درمان های تازه آن

رضا قوطاسلو^۱، بهناز صلاحی اشلقی^۲

دریافت مقاله: ۹۱/۵/۱۴ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۱/۸/۲۱ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۱/۹/۲۰ پذیرش مقاله: ۹۱/۹/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: بیوفیلیم های میکروبی در ۶۵٪ عفونت های انسان دیده می شوند. باکتری های موجود در بیوفیلیم نسبت به آنتی بیوتیک ها مقاوم هستند. پseudomonas/ایروژینوزا یکی از مهم ترین باکتری های ایجادکننده بیوفیلیم می باشد. در این مقاله مروری سعی داریم آخرین تئوری های تشکیل بیوفیلیم، دلایل مقاومت و روش های جدید پیشگیری و درمان بیوفیلیم "پseudomonas/ایروژینوزا" را مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش ها: در این مطالعه مروری کلمات کلیدی بیوفیلیم و مواد ضد بیوفیلیم و درمان بیوفیلیم و پseudomonas/ایروژینوزا در منابع اطلاعاتی Daneshyar network, DOAJ, ProQuest, Ovid, Elsevier Sciences, Google Scholar و Pub Med و Integrated Digital Library مورد جستجو قرار گرفت.

یافته ها: درمان فعلی عفونت های منتسب به بیوفیلیم سخت و پزشکان با معضلات زیادی روبرو هستند. به دلیل خواص متمایز بیوفیلیم ها مقاومت دارویی زیادی داشته و نیاز به درمان متفاوت دارد. محققان به دلیل اهمیت بیوفیلیم در ایجاد بیماری ها و مقاومت دارویی در جستجوی راه های مناسبی برای مهار و پیشگیری از تشکیل بیوفیلیم هستند. **نتیجه گیری:** به طور کلی تکنیک های مقابله با تشکیل بیوفیلیم شامل تغییر پوشش سطحی و تکنیک های فیزیکی است. به دلیل مقاومت بیوفیلیم ها به آنتی بیوتیک های فعلی، درمان های غیر متعارف گوناگونی از گوشه و کنار جهان گزارش شده است.

واژه های کلیدی: بیوفیلیم، پseudomonas/ایروژینوزا، مواد ضد بیوفیلیم

مقدمه

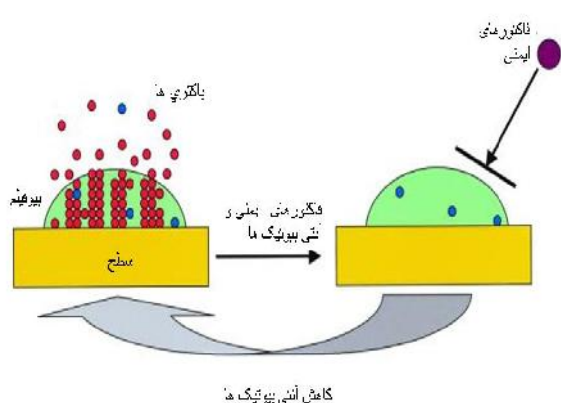
پیچیده باکتری ها هستند که در یک پوشش

گلیکوکالیکس محصور شده و به سطوح مخاطی می چسبند [۲]. تشکیل بیوفیلیم در گونه های مختلف

در طبیعت باکتری ها به دو شکل پلانکتونیک و بیوفیلیم یافت می شوند [۱]. بیوفیلیم های باکتریایی، تجمعات

۱- (نویسنده مسئول) دانشیار گروه آموزشی میکروبیشناسی بالینی، دپارتمان میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۶۴۶۶۱، دورنگار: ۰۴۱۱-۳۳۶۴۶۶۱، پست الکترونیکی: rzgottaslo@yahoo.com

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد مامایی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران



شکل ۱- تأثیر آنتی بیوتیک و سیستم ایمنی بر علیه بیوفیلیم

آنتی بیوتیک ها و سیستم ایمنی میزبان، بیشتر باکتری های موجود در سطح بیوفیلیم را نابود کرده اما بر باکتری های عمق بیوفیلیم تأثیر ندارند [۹]. پس از قطع آنتی بیوتیک، باکتری های مقیم بیوفیلیم رشد و تکثیر پیدا نموده و بیماری عفونی برگشت دوباره ای خواهد داشت. از طرفی اگر سیستم ایمنی میزبان مشکل داشته باشد مقاومت دارویی و عود زودتر مشاهده می شود [۹، ۱].

این مطالعه با هدف بررسی آخرین تئوری های تشکیل بیوفیلیم، دلایل مقاومت و روش های جدید پیشگیری و درمان بیوفیلیم پسودوموناس ایروژینوزا انجام شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه مروری، کلمات کلیدی بیوفیلیم و مواد ضد بیوفیلیم و درمان بیوفیلیم و پسودوموناس/ایروژینوزا در منابع اطلاعاتی Daneshyar network, DOAJ, Pub Med ProQuest, Ovid, Elsevier Sciences, Google Scholar و Integrated Digital Library در طی ۲۲ سال اخیر مورد جستجو قرار گرفت. مقاله های تکراری حذف شدند. در مجموع ۳۱۰ مقاله یافت شد و متن ۱۱۸ مقاله مرتبط مطالعه و در این مقاله مروری مورد استفاده قرار گرفت.

باکتری ها از جمله پسودوموناس/ایروژینوزا مشاهده شده است. تشکیل بیوفیلیم های پسودوموناسی در راه های هوایی بیماران سیستمیس فیبروزیس، پنومونی همراه با ونتیلاتور و بیماران ریوی مزمن، یکی از عوامل مهم در طولانی شدن دوره درمان، تشدید علایم بالینی و حتی مرگ بیماران می باشد [۳-۵]. همچنین، بیوفیلیم در عفونت های جسم خارجی مانند دریچه های مصنوعی قلب، دندان، کاتتر، مفصل مصنوعی و سوند ادراری مشاهده می شوند [۶-۸]. عفونت های بیوفیلیم حتی در اشخاص سالم با سیستم ایمنی مناسب هم ندرتاً خوب شده و بافت مجاور بیوفیلیم به دلیل پاسخ ایمنی دچار تخریب می شوند و تا زمانی که جراحی نشده و یا وسیله خارجی برداشته نشوند، عفونت پابرجا خواهد بود [۹-۱۰].

مهم ترین خاصیت متمایز بیوفیلیم ها تفاوت در رشد آن ها می باشد که سبب مقاومت دارویی و نیاز به درمان متفاوت و روش های متمایز شناسایی بیوفیلیم ها می گردد [۶]. این توده ها مانند اسپور باکتری ها به آنتی بیوتیک ها مقاوم بوده [۹] به طوری که بعضی از محققین ادعا می کنند که مقاومت بیوفیلیم نسبت به آنتی بیوتیک ها هزار برابر پلانکتونیک است [۵، ۸-۱۰]. بیوفیلیم ها با عوامل ضد باکتریایی مثل ضد عفونی کننده ها، حرارت، خشک کردن از بین نمی روند و بر روی سطح باقی مانده و خصوصاً در بیمارستان ها سبب آلودگی و انتقال بیماری های عفونی می گردند [۱۱] و به طور فیزیکی از باکتری ها در برابر سیستم ایمنی میزبان و آنتی بیوتیک ها محافظت می کند [۱۲-۱۳]. این پدیده یکی از علل عود بیماری های عفونی می باشد (شکل-۱).

بحث

مراحل تشکیل بیوفیلیم: بیوفیلیم در ۵ مرحله ایجاد می‌شود. مرحله نخست اتصال اولیه است که در عرض چند ثانیه و توسط نیروهای واندروالس (Vandervals) صورت می‌گیرد و برگشت‌پذیر است. پیلی (Pilli) و مولکول‌های چسبنده در این اتصال نقش دارند. مرحله دوم اتصال غیرقابل برگشتی است که حرکت سلول‌ها کم شده و باکتری‌ها تجمع می‌یابند. اگزوپلی‌ساکارید خارجی تولید شده که در مورد *پسودوموناس/ایروژینوزا* از جنس آلژینات است و نقش خانه را برای میکروارگانیسم‌ها ایفا می‌نماید. مرحله سوم با افزایش ضخامت تا ۱۰ میلی‌متر و با اتصال و تجمع باکتری‌ها همراه است. بیوفیلیم با افزایش ضخامت به بیش از ۱۰ میلی‌متر تشکیل می‌گردد. در مرحله آخر، تولید سلول‌های دختر و جدا شدن سلول‌ها اتفاق می‌افتد. بعضی از مقالات این مرحله را "حرکت موقت" می‌نامند [۱۴].

دلیل ایجاد بیوفیلیم: میکروارگانیسم‌های موجود در بیوفیلیم به سطوح چسبیده و در بین آن‌ها تقسیم کار صورت می‌گیرد. در واقع، قابلیت متابولیکی جامعه سلولی در سطح مطلوبی افزایش می‌یابد. کلونیزاسیون راحت‌تر صورت می‌گیرد و در برابر جریان خون و ادرار پابرجا مانده و باکتری‌های بیوفیلیم از دسترس سیستم ایمنی میزبان مانند فاگوسیتوز در امان می‌مانند. انتقال ژن راحت‌تر صورت می‌گیرد و به دنبال آن ژن‌های ویروالانس تولید و غلظت بالایی از سم خارجی (اگزوتوکسین) ایجاد می‌شود. کوپروم سنسینگ (Quorum Sensing) یک نوع ارتباط خاص بین باکتری‌ها است و به تشکیل بیوفیلیم باکتری‌ها کمک نموده و آن‌ها را در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها محافظت

می‌کند [۵-۱۰]. در بیماران دچار سیستمیک فیبروزیس، *استافیلوکوک اورئوس* و *پسودوموناس/ایروژینوزا* اغلب باهم یافت می‌شوند [۱۵-۱۶]. گزارش شده است که *پسودوموناس/ایروژینوزا* ماده‌ای به نام HQNO (hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide) تولید می‌کند که باعث تشکیل کلنی‌های ریز استافیلوکوک اورئوس با رشد آهسته و بیوفیلیم می‌گردد. در واقع استافیلوکوک توانایی زندگی در مجاورت *پسودوموناس/ایروژینوزا* را پیدا می‌نماید [۱۷]. در بیماران سیستمیک فیبروزیس کلنی‌های ریز *استافیلوکوک اورئوس* با رشد آهسته فراوان جدا می‌شود و درمان آن‌ها سخت است [۱۷]. HQNO سبب تحریک تولید بیوفیلیم در استافیلوکوک‌های نرمال می‌گردد اما روی استافیلوکوک اورئوس کلنی‌های ریز چنین تأثیری ندارد [۱۸]. بنابراین، تولید این ماده در بیماران سیستمیک فیبروزیس باعث تشکیل کلنی‌های ریز *استافیلوکوک اورئوس*، مزمن شدن عفونت‌ها، تولید بیوفیلیم و مقاومت‌های دارویی می‌گردد.

تشخیص بیوفیلیم: می‌توان از میکروسکوپ نوری برای شناسایی بیوفیلیم در نمونه‌های بالینی استفاده کرد، گرچه تشخیص قطعی با تکنیک‌های هیبریدیزاسیون DNA و رنگ آمیزی اختصاصی ماتریکس مقدور است [۶]. نمونه‌برداری معمولی برای کشت و آنتی‌بیوگرام بیوفیلیم مناسب نیست و روش‌های خاصی برای کشت، شناسایی و آنتی‌بیوگرام بیوفیلیم وجود دارند.

دلایل مقاومت بیوفیلیم‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها: پس از این که اهمیت بیوفیلیم‌ها در ایجاد عفونت‌ها خصوصاً عفونت‌های بیمارستانی مشخص گردید، تحقیق روی مکانیسم مقاومت‌های دارویی بیوفیلیم‌ها افزایش پیدا کرد

[۶]. تاکنون درباره علل مقاومت باکتری های مقیم بیوفیلیم چهار دلیل اصلی ارائه شده است:

الف) فنوتیپ تطبیقی: فنوتیپ مقاوم در بیوفیلیم تطابق پیدا نموده و باقی می ماند و توسط آنتی بیوتیک از بین نمی رود. بعد از مدتی فنوتیپ مقاوم، نوع غالب خواهد بود. حدس می زنند که حدود ۱/۰٪ تا ۱۰٪ باکتری های بیوفیلیم مقاوم باشند [۱۹]. زمانی که آنتی بیوتیک قطع می گردد باکتری ها رشد مجدد کرده و فعالیت خود را آغاز نموده و یک بیوفیلیم تازه تشکیل می دهند و به همین دلیل بیماری عفونی عود پیدا می کنند [۹].

ب) محدودیت ورود آنتی بیوتیک: خصوصیات اگزوپلی ساکارید مانع درمان مؤثر بیوفیلیم ها می گردد. آنتی بیوتیک به اگزوپلی ساکارید وارد شده اما در آن رقیق شده و زمانی که به سلول باکتری می رسد غلظت کافی برای از بین بردن باکتری ها را پیدا نمی کند [۲۰]. به همین علت در درمان بیوفیلیم توصیه می شود دارو با دوز بالا تجویز شود. در واقع بیوفیلیم به عنوان سد غیر قابل نفوذ عمل کرده و مانع نفوذ آنتی بیوتیک شده و یا با مولکول های اگزوپلی ساکارید واکنش می دهد [۲۱]. شارژ منفی اگزوپلی ساکارید از ورود آنتی بیوتیک های با شارژ مثبت مانند آمینوگلیکوزیدها به دلیل اتصال مولکولی یا واکنش شیمیایی جلوگیری می نماید. اگر آنتی بیوتیک به سطوح بیوفیلیم اتصال یابد طبیعی است که نمی تواند به عمق بیوفیلیم نفوذ و اثر نماید [۹، ۱۱]. ماتریکس بیوفیلیم پseudomonas/ایروژینوزا حاوی آلژینات، پروتئین های میزبان و DNA خارج سلولی است [۲۲-۲۴]. DNA خارج سلولی در باکتری های گرم مثبت و منفی در نگهداری ساختمان سه بعدی بیوفیلیم شرکت دارد [۲۴]. DNA ژنومیک در سطح بیوفیلیم قرار دارد [۲۵]. DNA اصلی

بیوفیلیم از باکتری های مرده یا سلول های ایمنی میزبان و DNA غشای سیتوپلاسمی منشأ می گیرد [۲۷-۲۶، ۵]. DNA خارج سلولی در فعالیت ضد آنتی بیوتیکی بیوفیلیم نقش داشته و به علت آنیونیک بودن، به عنوان جذب کننده کاتیونیک عمل می نماید [۵]. این کار باعث تغییر ژن های لیپوپلی ساکارید و مقاومت آنتی بیوتیکی می گردد. Mulcahy و همکاران معتقدند غلظت های بالای DNA در ماتریکس بیوفیلیم سبب القای اپرون PhoPQ و PmrAB تنظیم کننده مقاومت به آنتی بیوتیک های کاتیونیک می گردد. از طرفی DNA خارج سلولی سبب افزایش مقاومت به آمینوگلیکوزیدها (حدود ۶۴۰ برابر) می شوند اما روی بتالاکتام ها و فلیوروکینولون ها تأثیر ندارد [۵].

پ) متابولیسم کاهش یافته و رشد آهسته: سلول های موجود در عمق بیوفیلیم از نظر متابولیسم غیرفعال بوده و به همین دلیل به دارو کمتر حساس هستند [۲۸-۲۹]. اکسیژن و گلوکز در سطح بیوفیلیم مصرف شده و در عمق بیوفیلیم فضای بی هوازی حاکم است. باکتری ها در شرایط بی هوازی با رشد آهسته و یا عدم رشد مواجه هستند [۳۰]. از طرفی حساسیت و مقاومت باکتری ها به سن بیوفیلیم هم ارتباط دارد. بیوفیلیم های کهنه (بیش از ۱۰ روز) مقاوم تر از بیوفیلیم های تازه (کمتر از ۲ روز) هستند [۳۱]. به همین دلیل پیشگیری اهمیت پیدا می کند و توصیه می شود بیوفیلیم ها زودتر شناسایی و درمان شوند. از طرفی بعضی از آنتی بیوتیک ها مانند آمینوگلیکوزیدها به علت محیط بی هوازی، تجمع مواد اسیدی و کاهش pH در بیوفیلیم کاهش فعالیت نشان می دهند [۹]. محیط اسموتیک بالای بیوفیلیم منجر به القای پاسخ استرس می گردد. عده ای معتقدند دلیل اصلی رشد آهسته

باکتری‌ها در عمق بیوفیلیم به دلیل کمبود مواد غذایی نبوده بلکه به علت پاسخ عمومی به استرس در بیوفیلیم است [۳۲-۳۴]. در زمان استرس پاسخ‌های فیزیولوژیکی در باکتری بوجود آمده و سلول را از اثرات شوک، سرما، حرارت، اسیدیته و آنتی‌بیوتیک‌ها محافظت می‌کنند [۳۵]. تنظیم‌کننده اصلی استرس فاکتور سیگما [RpoS] است که در مرحله توقف منحنی رشد اعمال تأثیر می‌نماید [۳۲]. مطالعات اخیر ثابت می‌کند که در بیوفیلیم به دلیل تعداد بالای سلول، RpoS القا و منجر به پاسخ استرسی و تولید تره‌هالوز (محافظت‌کننده اسمولاریته) و کاتالاز (محافظت‌کننده رادیکال هیدروکسیل) می‌شود [۳۶]. Foley به روش RT-PCR (Real Time-PCR) نشان داد که در خلط بیماران سیستمیک فیبروزیس میزان RpoS-mRNA بالا است [۳۷]. در *پسودوموناس/ایروژینوزا* فاکتور سیگمای دیگری به نام Alg است که پاسخ استرس را تنظیم می‌نماید [۳۷، ۳۳].

ت‌ژن‌های مقاومت اختصاصی: یکی از علل مقاومت دارویی بیوفیلیم داشتن ژن‌های اختصاصی مقاومت است که در نوع پلانکتونیک بیان نمی‌شوند [۳۸-۳۹، ۸]. جهش در باکتری‌های بیوفیلیم در مقایسه با فرم پلانکتونیک زیاد و انتقال افقی ژن راحت‌تر صورت می‌گیرد و به همین دلیل به طور دسته جمعی به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌شوند. اغلب باکتری‌های بیوفیلیم دارای مقاومت چندگانه هستند [۶]. ژن ampC سبب مقاومت به بتالاکتام‌ها می‌گردد. بیان ampC توسط AmpR تنظیم می‌شود و نزدیک ژن ampC قرار دارد [۴۰]. در مطالعات قبلی نشان داده شده که AmpR تنظیم‌کننده ampC و کوپروم سنسینگ است [۴۱، ۶]. AmpR در بیان بیش از ۱۰۰ ژن *پسودوموناس/ایروژینوزا* نقش دارد [۴۲]. دانشمندان آمریکایی معتقدند

AmpR در تنظیم بیوفیلیم به طور مستقیم و غیر مستقیم نقش دارد. توانایی تولید بیوفیلیم در سویه‌های جهش یافته در ژن ampR بهتر از سویه‌های بدون جهش است. این موضوع نشان‌دهنده نقش تنظیم‌کنندگی منفی AmpR در تولید بیوفیلیم می‌باشد. Zhang و همکاران در سال ۲۰۰۸ یک سیستم جدید خروج دارو در *پسودوموناس/ایروژینوزا* ایجادکننده بیوفیلیم یافته‌اند و به نظر می‌رسد در مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیوفیلیم‌ها نقش دارد [۴۳]. پمپ افلاکس مذکور سبب مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و کینولون‌ها شده و در باکتری‌های بیوفیلیم نسبت به فرم پلانکتونیک بیشتر بیان می‌شوند. ژن response aminoglycoside arr (regulator) در *پسودوموناس/ایروژینوزا* تنظیم‌کننده پاسخ به آمینوگلیکوزیدها است. این ژن برای تحریک و ایجاد بیوفیلیم مقاوم به آمینوگلیکوزیدها ضروری می‌باشد [۴۴]. این ژن، یک آنزیم فسفودی استراز غشاء داخلی باکتری را کد کرده که سوبسترای این آنزیم ترکیبی به نام di-GMP حلقوی می‌باشد. di-GMP حلقوی، یک پیام‌بر ثانویه در سلول باکتری است که اتصالات به سطوح را تنظیم می‌نماید. با موتاسیون در ژن ait، فعالیت فسفودی استراز کاهش و سویه‌های جهش یافته قادر به تشکیل بیوفیلیم و مقاومت به توپرامایسین نمی‌باشند. تحقیقات نشان می‌دهد که تشکیل بیوفیلیم توسط باکتری می‌تواند یک واکنش اختصاصی باکتری برای دفاع در برابر آنتی‌بیوتیک باشد که اساس مولکولی این پاسخ، در تغییر سطح di-GMP حلقوی است و با تمرکز بر این مکانیسم، می‌توان داروها و راهکارهای جدیدی برای درمان عفونت‌های مزمن ناشی از باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلیم طراحی نمود [۴۴]. علاوه بر دلایل فوق، علل دیگری ممکن است در مقاومت باکتری‌های مقیم بیوفیلیم دخالت داشته باشند.

شکل ۲- تکنیک‌های جلوگیری از بیوفیلیم

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

آنتی‌بیوتیک‌ها را به محل ضایعه رسانده و باعث مرگ باکتری‌ها می‌گردند [۵۶-۵۷].

ترکیب درمانی: تعدادی از محققین فعالیت هم‌افزایی و ترکیب درمانی را بر علیه بیوفیلیم *پسودوموناس/یروژینوزا* پیشنهاد می‌کنند [۵۸-۵۹]. Tré-Hardy و همکاران فعالیت آزمایشگاهی داروهای توبرامایسین/کلاریترومایسین بر علیه بیوفیلیم *پسودوموناس/یروژینوزا* را مورد بررسی قرار داده و مقدار فعالیت دو داروی فوق را پس از ۱۲ ساعت و ۱۲ روز مورد مطالعه قرار دادند [۵۸]. در این تحقیق تأثیر دو دارو بیشتر از تأثیر هرکدام به تنهایی بود. این محققان نشان دادند که توبرامایسین/کلاریترومایسین اثر سینرژیستی ضد بیوفیلیم *پسودوموناس/یروژینوزا* داشته که احتمالاً به دلیل افزایش نفوذپذیری در بیوفیلیم می‌باشد. نویسندگان مقاله معتقدند این داروها روی بیوفیلیم بالغ هم مؤثر بوده و توصیه می‌نمایند در بیماران دارای بیوفیلیم *پسودوموناس/یروژینوزا* مانند بیماران سیستمیک فیبروزیس از ترکیب توبرامایسین/کلاریترومایسین استفاده شود. گزارش شده که کلاریترومایسین روی حرکت باکتری اثر گذاشته و مانع تشکیل بیوفیلیم می‌گردد [۶۰]. گروه علمی مطالعه سیستمیک فیبروزیس گزارش کرده است که توبرامایسین/کلاریترومایسین روی آنزیم گوانوزین دی-فسفات-دی مانوز دهیدروژناز اثر گذاشته و از سنتز آلژینات جلوگیری می‌نماید [۶۱].

سفالوسپورین‌های جدید: دانشمندان با توجه به قدرت خارق‌العاده *پسودوموناس/یروژینوزا* در تشکیل بیوفیلیم، ایجاد جهش و مقاومت آنتی‌بیوتیکی به دنبال کشف داروهای جدیدی هستند. یکی از شایع‌ترین جهش‌های تطبیقی *پسودوموناس/یروژینوزا* عامل عفونت‌های ریه،

غیرفعال شدن ژن *mucA* است که منجر به تولید بیش از حد آلژینات می‌گردد [۶۲]. سوبه‌های موکوییدی *پسودوموناس/یروژینوزا* باعث کاهش کلیرانس باکتریایی و همچنین مهار فاگوسیتوز، فعال شدن کمپلمان، نفوذ آنتی‌بیوتیک و خنثی‌سازی رادیکال‌های اکسیژن می‌گردد [۶۳]. اخیراً سفالوسپورین جدیدی به نام CXA-101 تحت کارآزمایی بالینی قرار گرفته و به نظر می‌رسد برتری‌های خاصی علیه *پسودوموناس/یروژینوزا* دارد [۶۴]. نشان داده شده که این داروی نوین در بیماران ریوی مزمن و سیستمیک فیبروزیس مناسب و در برابر جهش‌های ایجاد شده در *پسودوموناس/یروژینوزا* مقاوم است [۶۵-۶۶]. Riera و همکاران در سال ۲۰۱۰ میزان فعالیت CXA-101 در بیماران مزمن ریوی دچار عفونت *پسودوموناس* را با سفتازیدیم، مروپنم و سیپروفلوکساسین مورد مقایسه قرار دادند [۶۷]. این مطالعه نشان می‌دهد که CXA-101 فعالیت باکتری‌کشی مستقل از غلظت دارو داشته و قدرتمندترین دارو بر علیه سوبه‌های موکوییدی جهش یافته *پسودوموناس/یروژینوزا* می‌باشد. فراوانی جهش‌های *پسودوموناس/یروژینوزا* زمانی که در معرض CXA-101 قرار می‌گیرد بسیار کم [کمتر از 5×10^{-11}] است. این مطالعه قویاً ثابت می‌کند که جهش‌های منفرد در *پسودوموناس/یروژینوزا* تولیدکننده بیوفیلیم توانایی القای مقاومت نسبت به CXA-101 نمی‌باشد. چنین خاصیت جالب توجه CXA-101 را برای درمان بیماران دچار عفونت مزمن ریوی و سیستمیک فیبروزیس، برونشکتازی بسیار ایده‌آل می‌سازد و بهتر است در مدل‌های حیوانی نیز آزمایش شود.

ان-استیل سیتوزین: ان-استیل سیتوزین ماده ضد باکتریایی غیر آنتی‌بیوتیکی است [۱۹]. اثر ضدباکتریایی

این ماده احتمالاً مهار رقابتی سیتوزین یا واکنش با پروتئین های باکتری ها به دلیل داشتن گروه سولفیدریل می باشد [۶۸]. ان- استیل سیتوزین لیزکننده موکوس است [۶۹]. اثبات شده که این ماده مانع تشکیل بیوفیلیم می گردد [۷۰-۷۱] و باعث کاهش تولید ماتریکس پلی ساکاریدی خارج سلولی و اختلال در بیوفیلیم بالغ می شود [۷۰، ۷۲]. Zhao و همکارش اثر ان- استیل سیتوزین روی بیوفیلیم پَسودوموناس/ایروژینوزا را مورد مطالعه قرار دادند [۶۹]. MIC این ماده روی ۱۸ پَسودوموناس/ایروژینوزا بین ۱۰ تا ۴۰ میلی گرم در میلی لیتر بود. این دو محقق چینی اثر ان- استیل سیتوزین و سیپروفلوگساسین را بر روی بیوفیلیم پَسودوموناس/ایروژینوزا آزمایش کرده و گزارش نموده اند که این دو خاصیت هم افزایی دارند. اگر عفونت با بیوفیلیم پَسودوموناس/ایروژینوزا مزمن شود، درمان آن سخت می گردد [۷۳]. به همین دلیل یافتن داروهای جدید ضد بیوفیلیم مانند ان- استیل سیتوزین اهمیت فوق العاده ای دارد. خاطر نشان می گردد هنوز ان- استیل سیتوزین کارآزمایی بالینی نشده است. می توان ان- استیل سیتوزین را به شکل آبروسل، خوراکی یا داخل وریدی تجویز نمود. شکل آبروسل برای درمان عفونت های مزمن ریوی مانند سیستیک فیبروزیس، برونشکتازی، برونشیت مزمن مناسب بوده و باعث مهار تولید بیوفیلیم می گردد.

شلاتورهای فلزات: شلاتورهای فلزات مانند EDTA سبب لیز و افزایش حساسیت به عوامل ضد میکروبی در شکل پلانکتونیک باکتری ها می شود [۷۴]. به همین دلیل EDTA به عنوان نگهدارنده در اغلب محصولات بکار می رود [۷۵]. Raad و همکارانش ترکیب EDTA با مینوسایکلین را برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلیم

استافیلوکوک اپیدرمیدیس، استافیلوکوک اورئوس، کاندیدا آلبیکانس و پَسودوموناس/ایروژینوزا مورد بررسی و گزارش نموده اند که این دو باعث کاهش شدید باکتری های بیوفیلیم می شوند [۷۶]. Kite و همکارانش گزارش کرده اند که EDTA دارای سه سدیم باعث مرگ بیوفیلیم های کاترها می شود [۷۷]. Ayres و همکاران عقیده دارند EDTA سبب افزایش نفوذپذیری در بیوفیلیم ها می گردد [۷۸]. Banin و همکاران معتقدند EDTA بر روی سلول های پَسودوموناس/ایروژینوزا زنده بیوفیلیم تأثیر دارد [۷۹]. این اثر به دلیل خاصیت شلات کننده کاتیون های دو ظرفیتی است. این یون ها در پایدار کردن ساختار ماتریکس آلژینات نقش دارد. قبلاً نقش کلسیم در پایدار کردن بیوفیلیم باکتری ها گزارش شده است [۸۰-۸۱]. EDTA یون های آهن، منیزیم و کلسیم باکتری را شلات کرده و باعث عدم اتصال به بیوفیلیم می شود. Banin و همکارانش معتقد هستند EDTA با شلات کردن منیزیم لیپوپلی ساکارید باکتری های گرم منفی سبب آزاد شدن لیپوپلی ساکارید مرگ باکتری می شود. این محققین آمریکایی ادعا دارند که اثر باکتری کشی EDTA هزار برابر جنتامایسین است. همچنین، گزارش نموده اند که در درمان بیوفیلیم های پَسودوموناس/ایروژینوزا ترکیب جنتامایسین/ EDTA بسیار مؤثرتر است [۷۹].

کرم ها: به دلیل مقاومت بیوفیلیم ها به آنتی بیوتیک های فعلی، درمان های غیر متعارف گوناگونی از گوشه و کنار جهان گزارش شده است. Van der Plas و همکاران برای رفع این معضل اثر کرم ها روی بیوفیلیم استافیلوکوک اورئوس و پَسودوموناس/ایروژینوزا را مورد آزمایش قرار دادند [۸۲]. محققان هلندی کرم ها را در درمان بیوفیلیم های هر دو باکتری مورد مطالعه مؤثر گزارش

کرده‌اند اما روی *پسودوموناس/ایروژینوزا* دیرتر اثر می‌نمایند. در مورد بیوفیلیم *پسودوموناس/ایروژینوزا* مقدار ماده مؤثر بیشتری نسبت به نوع استافیلوکوکی مورد نیاز است. آن‌ها پیشنهاد می‌کنند اگر کرم‌ها به همراه آنتی‌بیوتیک به کار رود تأثیر آن بیشتر خواهد بود. قبلاً استفاده از کرم‌های استریل *Lucilia sericata* در درمان زخم‌ها خصوصاً زخم‌های جراحی مورد استفاده قرار گرفته است [۸۳-۸۴]. کرم‌های مذکور بافت اضافی زخم‌ها را برداشته و از پاسخ آماسی جلوگیری و سبب تسریع بهبودی زخم‌ها می‌شود [۸۵]. مولکول‌های مترشحه و دفعی کرم‌ها عامل این اثر شگفت‌انگیز می‌باشد [۸۲].

کشف اهداف دارویی جدید بر علیه *پسودوموناس/ایروژینوزا* موجود در بیوفیلیم با کمک کامپیوتر: با توجه به عدم تأثیر مناسب آنتی‌بیوتیک‌های فعلی بر علیه *پسودوموناس/ایروژینوزا* موجود در بیوفیلیم، دانشمندان دنبال اهداف دیگری در این باکتری‌های مقاوم هستند. برای نیل به این هدف، مدل‌های کامپیوتری در کانون توجه قرار دارند [۸۶] که در این راستا ژنوم باکتری و مسیرهای متابولیکی کمک‌کننده خواهد بود. یکی از این سیستم‌های بیولوژی کامپیوتری کبری (Constraint-Based Reconstruction and Analysis= COBRA) می‌باشد [۸۷]. سیستم کبری توانایی تحلیل ژن‌های شبکه‌های بیوشیمیایی باکتری‌ها را داشته و می‌توان از آن برای طراحی، پیشگویی و سازماندهی پارامترهای ناشناخته به کار برد [۸۸-۸۹]. هم‌اکنون یکی از نیازهای مبرم جامعه پزشکی داروهای مؤثر بر بیوفیلیم *پسودوموناس/ایروژینوزا* می‌باشد و اهداف متابولیکی باکتری‌ها نامزد مناسبی برای نسل جدید داروهای ضد بیوفیلیم هستند [۹۰].

تأثیر عسل بر روی بیوفیلیم: استفاده از مواد طبیعی مانند عسل برای درمان بیوفیلیم به دلیل معضلات فراوان درمان فعلی بیوفیلیم‌ها مورد توجه قرار گرفته است. برای درمان عفونت‌های زخم سوختگی، عسل از قدیم الایام به کار رفته و طی چندین مطالعه خاصیت ضد باکتریایی آن نشان داده شده است [۹۱-۹۲]. Alandejani و همکاران در آزمایشگاه تأثیر عسل روی بیوفیلیم باکتری‌ها از جمله *پسودوموناس/ایروژینوزا* را مورد بررسی قرار دادند [۹۳]. این محققین ادعا می‌کنند عسل خاصیت باکتری‌کشی خوبی بر علیه باکتری‌های بیوفیلیم داشته و میزان باکتری‌کشی آن برای از بین بردن *پسودوموناس/ایروژینوزا* ۹۱٪ است.

مهارکننده‌های کوپوروم سنسینگ: حدود ۱۰٪ از ژنوم *پسودوموناس/ایروژینوزا* (حدود ۳۰۰ ژن) نقش تنظیم‌کننده کوپوروم سنسینگ داشته و لاکتون‌ها سیگنال اصلی شروع کننده کوپوروم سنسینگ می‌باشند [۹۴]. محققان با توجه به نقش مهم کوپوروم سنسینگ در ایجاد بیوفیلیم، دنبال مهارکننده‌های کوپوروم سنسینگ برای مقابله با بیوفیلیم هستند. مهارکننده‌های کوپوروم سنسینگ به طور طبیعی و ساختگی وجود دارند [۶]. چندین گزارش مبنی بر اثرات خوب مهارکننده‌های کوپوروم سنسینگ در کنترل بیوفیلیم و مقاومت‌های دارویی وجود دارد [۹۵-۹۶، ۶]. محققان با تغییراتی روی مهارکننده‌های طبیعی سعی دارند از آن‌ها برای درمان بیوفیلیم استفاده نمایند [۶]. تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند ماکرولیدها خصوصاً آزیترومایسین، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین روی کوپوروم سنسینگ *پسودوموناس/ایروژینوزا* اثر مهاری دارند. کارآزمایی بالینی نشان داده‌اند که آزیترومایسین سبب بهبود وضعیت عمومی بیماران

سیستیک فیبروزیس می گردد [۹۸-۹۷]. هم اکنون آزیتروماکسین برای درمان عفونت های مزمن بیوفیلیم مانند سیستیک فیبروزیس استفاده می شود [۶]. در سیر، ماده مهارکننده کوپوروم سنسینگ وجود دارد که می توان مصرف آن را در عفونت های مزمن ریوی توصیه کرد. از طرفی سیر باعث افزایش فعالیت گلبول های چند هسته ای می گردد [۹۹]. Kiran و همکاران برای بررسی اثر مهارکننده های کوپوروم سنسینگ از آنزیم لاکتوناژ استخراج شده از پلاسمیدها استفاده کردند که سبب تخریب لاکتون می شود [۹۶]. این محققان هندی نشان دادند لاکتوناژ اثر قابل توجهی در از بین بردن بیوفیلیم داشته و باعث کاهش MIC جنتامایسین و سیپروفلوکساسین می گردد. این تحقیق ارزش مهارکننده های کوپوروم سنسینگ را نشان داده و بنابراین می توان با دستکاری مسیر ساخت کوپوروم سنسینگ، جلوی تشکیل بیوفیلیم و مقاومت دارویی متعاقب آن را گرفت. در آینده با طراحی و ساخت داروهای مهارکننده کوپوروم سنسینگ شاهد بهبود مقاومت های دارویی خواهیم بود.

هالوژن ها: Kim و همکاران معتقدند سلول های خفته بیوفیلیم مهم ترین عامل مقاومت باکتری های موجود در بیوفیلیم به آنتی بیوتیک ها است [۱۰۰]. سلول های عمق بیوفیلیم به دلیل کاهش غلظت اکسیژن و مواد غذایی به حالت خفته در آمده و همانندسازی انجام نمی دهند [۳۳]. اغلب آنتی بیوتیک های رایج روی سلول های خفته تأثیر نمی گذارند [۱۰۲-۱۰۱، ۳۳]. از طرفی کاهش اکسیژن در عمق لایه های بیوفیلیم سبب تشدید مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها می گردد [۱۰۳]. به دلیل عدم تأثیر آنتی بیوتیک ها روی سلول های خفته بیوفیلیم، مواد

ضدمیکروبی غیرآنتی بیوتیکی مانند کلرها به دلیل عملکرد جداگانه ای که دارند توصیه شده است [۱۰۰].

اکسید نیترو: هم چنانکه توضیح داده شد سلول های بیوفیلیم در مرحله آخر تشکیل بیوفیلیم کنده و آزاد می شوند. مکانیسم دقیق این عمل هنوز مشخص نیست و احتمالاً به علت کوپوروم سنسینگ و فرایند پیچیده تمایز صورت می گیرد [۱۰۴]. استرس اکسیداتیو و استرس نیتروساتیو در این امر دخالت دارند [۱۰۵]. استرس اکسیداتیو در اثر تولید واسطه های اکسیژن مانند O_2^- , H_2O_2 , $HO-$ و واسطه های نیتروژن مانند NO , $ONOO-$, HNO_2 ایجاد می شود [۱۰۶]. در نتیجه پروتیین ها و اسیدهای نوکلئیک دچار آسیب می شوند. آب اکسیژنه نقش کشنده روی باکتری ها داشته و کوپوروم سنسینگ نقش مهمی در مقاومت در برابر هیدروکسید هیدروژن دارد. آب اکسیژنه سبب جهش در ژن کدکننده فاکتور ضد سیگما شده و بالاخره باعث تبدیل بیوفیلیم به شکل آزاد می شود [۱۰۴]. Yoon و همکاران نشان دادند که در شرایط بی هوازی واسطه های نیترواستاتیو خاصیت کوپوروم سنسینگ خود را از دست می دهند [۱۰۷]. این مواد غیر از خاصیت اتولیز در مسیرهای تنظیمی زیادی شرکت دارند [۱۰۸]. تولید NO در پسودوموناس / پروژینوزا سبب فعال شدن ژن های متابولیسم بی هوازی باکتری می گردد و در شرایط بی هوازی حاکم بر بیوفیلیم راحت تر ایجاد می شود [۱۰۹]. Barraud و همکاران گزارش کردند که پسودوموناس / پروژینوزا در مرحله توقف رشد در شرایط بی هوازی تولید رادیکال های آزاد نیتروژن کرده و از شکل بیوفیلیم به شکل آزاد تبدیل می گردد [۱۰۸]. این محققین معتقدند NO سیگنال آغازین تبدیل بیوفیلیم به شکل آزاد است و نقش

تنظیم کننده دارد. این محققین انگلیسی پیشنهاد می نمایند که از این گاز برای درمان بیوفیلیم استفاده گردد. گاز NO اتصال اولیه باکتری ها به سطوح را کاهش داده و باعث تمایز فرم بیوفیلیم به پلانکتونیک می شود (شکل ۳).



شکل ۳- تأثیر اکسید نیترو روی بیوفیلیم

با کتری آزاد به آنتی بیوتیک ها و سایر مواد ضد میکروبی بیشتر حساس می باشند. از طرفی اگر NO به همراه آنتی بیوتیک مصرف شود تأثیر آن بیشتر است.

در سال ۲۰۰۲ مولکول آزاد کننده مونواکسید کربن معرفی شده است [۱۱۰]. این ترکیبات حاوی فلزاتی است که به شکل ناپایدار به CO متصل هستند. دانشمندان معتقدند CO آزاد شده از این مولکول ها به پروتیین های زنجیره انتقال الکترون متصل و منجر به کاهش مصرف اکسیژن و مرگ باکتری می شود [۱۱۱-۱۱۲]. بنابراین می توان CO را جزو مواد ضد میکروبی محسوب کرد. Murray و همکاران یک مولکول آزاد کننده مونواکسید کربن به نام CORM-2 شناسایی نموده اند که روی بیوفیلیم پسودوموناس / یروژینوزا اثر مهاری داشته و از بلوغ بیوفیلیم جلوگیری نموده و بالاخره سبب مرگ باکتری می شود. اگر

CORM-2 با توبرامایسین مصرف شود اثر هم افزایی دارد [۱۰۶].

فاژ درمانی: استفاده از فاژها برای مبارزه و کنترل بیوفیلیم ها چندین مزیت دارد. اولاً در محل عفونت تکثیر پیدا نموده و در فاز لیتیک یک فاژ داخل یک باکتری شده و تبدیل به صدها فاژ می گردد. ثانیاً تعدادی از فاژها آنزیم هایی تولید نموده که اثر تخریبی روی ماتریکس بیوفیلیم دارد [۱۱۳-۱۱۴]. Curtin و همکاران در آزمایشگاه نشان دادند که فاژها روی بیوفیلیم استافیلوکوک اپیدیمییدیس تأثیر خوبی دارد [۱۱۵]. چندین مطالعه دیگر نشان دهنده تأثیر فاژها روی بیوفیلیم است [۱۱۴-۱۱۳، ۱۱۷-۱۱۶]. Fu و همکاران اثر فاژها روی بیوفیلیم پسودوموناس / یروژینوزا را بررسی و گزارش نمودند که اثر مهاری دارد [۱۱۸]. این محققین آمریکایی معتقدند استفاده از کوکتل فاژها بر روی وسایل پزشکی یک راه مناسب برای کاهش کلونیزاسیون باکتری و بیوفیلیم است. آنها توصیه می کنند فاژ درمانی روی موجودات زنده هم آزمایش شود. جدول ۱ راه های احتمالی آینده برای مهار بیوفیلیم را نشان می دهد.

جدول ۱- راه های احتمالی مهار بیوفیلیم در آینده

راه ها	جلوگیری از
اختلال در خصوصیات سطحی ایمپلنت ها	اتصال اولیه و کلونیزاسیون
جلوگیری از کوپروم سنسینگ	رفتار گروهی
با فعالیت بیشتر روی باکتری های مقاوم	کشته شدن کامل میکروارگانیسم
جلوگیری از تشکیل ماتریکس پلی ساکاریدی	تشکیل بیوفیلیم
با افزایش نفوذ پذیری بیوفیلیم	کشته شدن میکروارگانیسم ها
با خاموش کردن ژن های کد کننده بیوفیلیم	تشکیل بیوفیلیم

نتیجه گیری

با توجه به بررسی متون به عمل آمده باکتری های موجود در بیوفیلم نسبت به آنتی بیوتیک ها مقاوم هستند. درمان بیوفیلم هنوز یکی از معضلات مهم بشر بوده و نیاز به مطالعه بیشتری دارد. به طور کلی از بین بردن بیوفیلم ها پس از تشکیل سخت و طاقت فرسا است و بهتر است از تشکیل بیوفیلم جلوگیری شود. در این راستا شناساگرهای تشکیل بیوفیلم در تشخیص زود هنگام بیوفیلم کمک کننده خواهند بود. استفاده از آنتی بیوتیک های آهسته رهش یا به همراه حاملین پلی مری مؤثر می باشند. تحقیق روی ژنوم باکتری و طرز

تشکیل بیوفیلم در افزایش درک ما از خصوصیات فیزیولوژی بیوفیلم کمک می نماید. طراحی کامپیوتری اهداف جدیدی را آرایه کرده و با کمک سیستم های بیولوژیکی آنها برای درمان بیوفیلم پیشنهاد می نماید. شناسایی ژن های ویروالانس مؤثر بر تشکیل بیوفیلم و کلونیزاسیون راه را برای درمان بهتر بیوفیلم هموار می نماید. درک عمیق کوپروم سنسینگ و نقش آن در تشکیل بیوفیلم یکی دیگر از راه های مقابله می باشد. با توجه به عدم تأثیر مناسب آنتی بیوتیک های فعلی بر علیه پseudomonas/ایروژینوزا موجود در بیوفیلم دانشمندان دنبال اهداف درمانی دیگری هستند.

References

- [1] Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents and Chemother* 2001; 45(4): 999-1007.
- [2] Gilpin DF, Graham J, Elborn JS, Tunney MM. Biofilm foundation and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured before and after antibiotic treatment of an acute exacerbation of pulmonary infection. *J Cyst Fibros* 2008; 7(2): S39.
- [3] Wagner VE, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in CF infection. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008; 35(3): 124-34.
- [4] Parsek MR, Greenberg EP. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* 2005; 13: 27-33.
- [5] Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS Pathog* 2008; 4(11): e1000213.
- [6] Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu S. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Intern J Antimicrob Agents* 2010; 35 322-32.

- [7] Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB: Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15[2]: 194-222.
- [8] Fricks-Lima J, Hendrickson CM, Allgaier M, Zhuo H, Wiener-Kronish JP, Lynch SV, et al. Differences in biofilm formation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from airways of mechanically ventilated patients and cystic fibrosis patients. *Intern J Antimicrob Agents* 2011; 37, 309-15.
- [9] Stewart PS, Costerton JW, "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms". *Lancet* 2001, 358, 135-8.
- [10] Bjarnsholt T, Jensen PØ, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol* 2009; 44: 547-58.
- [11] Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005; 13(1): 20-6.
- [12] Hoyle BD, Jass, Costerton JW. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. *J Antimicrob Chemother* 1990; 26: 1-5
- [13] Von Eiff C, Heilmann C, Peters G. New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 843-6.
- [14] Prasanna SS, Doble M. Medical biofilms – Its formation and prevention using organic molecules. *J Ind Instit Sci* 2008; 88: 1.
- [15] Hoffman LR, Deziel E, D'Argenio DA, Lepine F, Emerson J, McNamara S, et al. Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(52): 19890-5.
- [16] Harrison F: Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 2007; 153[Pt 4]: 917-23.
- [17] Biswas L, Biswas R, Schlag M, Bertram R, Gotz F: Small-colony variant selection as a survival strategy for *Staphylococcus aureus* in the presence of *Pseudomonas aeruginosa* *Appl Environ Microbiol* 2009; 75(21): 6910-2.
- [18] Mitchell G, Séguin DL, Asselin A, Déziel E, Cantin AM, Frost EH, Michaud S, Malouin F. *Staphylococcus aureus* sigma B-dependent emergence of small-colony variants and biofilm production following exposure to *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide. *BMC Microbiol* 2010; 10: 33.
- [19] Roberts ME, Stewart PS. "Modeling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells". *Microbiology* 2005; 151: 75-80.
- [20] Dibdin GH, Assinder SJ, Nichols WW, Lambert PA, "Mathematical model of β -lactam penetration into a biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* while undergoing simultaneous inactivation by released β -lactamases", *J Antimicrob Chemother* 1996; 38: 757-69.

- [21] Donlan RM, Costerton JW, "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms". *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167-93.
- [22] Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10: 644-8.
- [23] Moreau-Marquis S, Stanton BA, O'Toole GA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulm Pharmacol Ther* 2008; 21: 595-9.
- [24] Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 2002; 295: 1487.
- [25] Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* 2006; 59: 1114-28.
- [26] Qin Z, Ou Y, Yang L, Zhu Y, Tolker-Nielsen T. Role of autolysin mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 2007; 153: 2083-92.
- [27] Schooling SR, Beveridge TJ. Membrane vesicles: An overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol* 2006; 188: 5945-57.
- [28] Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* 2001; 183: 6746-51.
- [29] Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 230: 13-8.
- [30] Gilbert P, Collier PJ, Brown MR. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: Biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1865-8.
- [31] Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 114-22.
- [32] Mah TC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *TRENDS in Microbiol* 2001; 9 (1): 34-9.
- [33] Brown MRW, Allison DG, Gilbert P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J Antimicrob Chemother* 1988; 22: 777-83.
- [34] Brown, M.R. and Barker, J. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. *Trends Microbiol* 1999; 7: 46-50.
- [35] Hengge-Aronis R. Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* 1996 (Neidhart, F.C. et al., eds), pp: 1497-512, ASM Press.
- [36] Liu XL. Global adaptations resulting from high population densities in *Escherichia coli* cultures. *J. Bacteriol* 2000; 182: 4158-64.

- [37] Foley I. General stress response master regulator *rpoS* is expressed in human infection: a possible role in chronicity. *J. Antimicrob. Chemother* 1999; 43: 164-5
- [38] Lynch SV, Dixon L, Benoit MR, Brodie EL, Keyhan M, Hu P, et al. Role of the *rapA* gene in controlling antibiotic resistance of *Escherichia coli* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3650-8.
- [39] Dagostino L, Goodman AE, Marshall KC: Physiological responses induced in bacteria adhering to surfaces. *Biofouling* 1991; 4: 113-9.
- [40] Lindquist S, Lindberg F, Normark S Binding of the *Citrobacter freundii* AmpR regulator to a single DNA site provides both autoregulation and activation of the inducible *ampC* beta-lactamase gene. *J Bacteriol* 1989; 171: 3746-53.
- [41] Bouza E, Burillo A, Munoz P. Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 265-74.
- [42] Balasubramanian D, Schnepfer L, Merighi M, Smith R, Narasimhan G. The Regulatory Repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -Lactamase Regulator AmpR Includes Virulence Genes. *PLoS ONE* 2012; 7(3): e34067.
- [43] Zhang L, Mah TF. Involvement of a Novel Efflux System in Biofilm-Specific Resistance to Antibiotics. *J Bacteriol* 2008; 190(13): 4447-52.
- [44] An S, Wu, Zhang LH. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersal by a cyclic Di-GMP phosphodiesterase with a putative hypoxic sensing domain. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(24): 8160-73.
- [45] Yousefi S, Farajnia S, Nahaei MR, Akhi MT, Ghotaslou R, Soroush MH, et al. Detection of metallo- β -lactamase-encoding genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in northwest of Iran. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 68: 322-25.
- [46] Rastegar LA, Bahrami HH, Alaghebandan R. "Pseudomonas infections in Tohid Burn Center", Iran. *Burns* 1998; 24: 637-41.
- [47] Ghorashi Z, Nazemi N, Ghotaslou R, Ghorashi S. Pattern of *Pseudomonas aeruginosa* drug resistance in Tabriz children hospital. *Pakistan J Biological Sci* 2010; 13: No 8
- [48] Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. "Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics", *Can J Vet Res* 2002; 66: 86-92.
- [49] Piozzi A, Francolini I, Occhiaperti L, Venditti M, Marconi W. "Antimicrobial activity of polyurethanes coated with antibiotics: a new approach to the realization of medical devices exempt from microbial colonization", *Int J Pharm* 2004; 280: 173-83.
- [50] Dannenberg C, Bierbach U, Rothe A, Beer J, D.Korholz. "Ethanol-lock technique in the treatment

- of bloodstream infections in pediatric oncology patients with broviac catheter", *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25: 616-21.
- [51] Barbaric D, Curtin J, Pearson L, Shaw PJ. "Role of hydrochloric acid in the treatment of central venous catheter infections in children with cancer". *Cancer* 2004; 101: 1866-72.
- [52] Chatzinikolaou I, Zipf TF, Hanna H, "Minocycline ethylenediaminetetraacetate lock solution for the prevention of implantable port infections in children with cancer". *Clin Infect Dis* 2003; 36: 116-9.
- [53] Costerton W, Ellis B, Lam K, Johnson F, Khoury AE. "Mechanism of electrical enhancement of efficacy of antibiotics in killing biofilm bacteria". *Antimicrob Agents Chemo* 1994; 38: 2803-9.
- [54] Rediske AM, Roeder BL, Nelson JL, Robison RL, Schaalje GB, Robison RA. "Pulsed ultrasound enhances the killing of *Escherichia coli* biofilms by aminoglycoside antibiotics in vivo". *Antimicrob Agents Chemo* 2000; 44: 771-2.
- [55] O'Neill JF, Hope CF, Wilson M. "Oral bacteria in multispecies biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue". *Lasers Surg Med* 2002; 31: 86-90.
- [56] Freiberg S, Zhu XX. "Polymer microspheres for controlled drug release". *Int J Pharm* 2004; 282: 1-18.
- [57] Varde NK, Pack DW. "Microspheres for controlled drug delivery". *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4: 35-51.
- [58] Tr'e-Hardy M, Vanderbist F, Traore H, Devleeschouwer MJ. In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: 329-36.
- [59] Abdi-Ali A, Mohammadi-Mehr M, Agha Alaei Y. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 196-200.
- [60] Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 1.
- [61] Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group; Ramsey BW, Pepe MS, Quan JM, Otto KL, Montgomery AB, Williams-Warren J, et al. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1999; 340: 23-30.
- [62] Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996; 60: 539-44.
- [63] Pedersen S, Kharazmi SA, Espersen F. *Pseudomonas aeruginosa* alginate in cystic fibrosis sputum and the inflammatory response. *Infect Immun* 1990; 58: 3363-8.

- [64] Moya B, Zamorano L, Juan C. Activity of a new cephalosporin, CXA-101 [FR264205], against b-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants selected in vitro and after antipseudomonal treatment of Intensive Care Unit patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 1213-7.
- [65] Takeda S, Ishii Y, Hatano K. Stability of FR264205 against AmpC b- lactamase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30: 443-5.
- [66] Bulik CC, Christensen H, Nicolau DP. In vitro potency of CXA-101, a novel cephalosporin, against resistant phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa*, including multi-drug resistant isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 557-9.
- [67] Riera E, Macia MD, Mena A, Mulet X, Pe´rez JL, Ge Y, Oliver A. Anti-biofilm and resistance suppression activities of CXA-101 against chronic respiratory infection phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1399-404.
- [68] El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella HA, Abd El-Baky RM, Gad GF. Effect of ciprofloxacin and N-acetylcysteine on bacterial adherence and biofilm formation on ureteral stent surfaces. *Pol J Microbiol* 2009; 58: 261-7.
- [69] Zhao T, Liu Y. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol* 2010; 10: 140.
- [70] Marchese A, Bozzolasco M, Gualco L, Debbia EA, Schito GC, Schito AM: Effect of fosfomycin alone and in combination with N-acetylcysteine on *E. coli* biofilms. *Intern J Antimicrob Agent* 2003; 22: S95-S100.
- [71] Schwandt LQ, Van Weissenbruch R, Stokroos I, Mei HC Van der, Busscher HJ, Albers FW: Prevention of biofilm formation by dairy products and acetylcysteine on voice prostheses in an artificial throat. *Acta Otolaryngol* 2004; 124: 726-31.
- [72] Olofsson AC, Hermansson M, Elwing H: N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 4814-22.
- [73] Martinez-Solano L, Macia MD, Fajardo A, Oliver A, Martinez JL: Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 1526-33.
- [74] Turakhia MH, Cooksey KE, Characklis WG. Influence of calcium-specific chelant on biofilm removal. *Appl Environ Microbiol* 1983; 46: 1236-8.
- [75] Raad I, Hachem R, Tcholakian RK, Sherertz R. Efficacy of minocycline and EDTA lock solution in preventing catheter-related bacteremia, septic phlebitis, and endocarditis in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 327-32
- [76] Raad I, Chatzinikolaou I, Chaiban G, Hanna H, Hachem R, Dvorak T, et al. In vitro and ex vivo

- activities of minocycline and EDTA against microorganisms embedded in biofilm on catheter surfaces. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3580-5.
- [77] Kite PK, Eastwood S, Sugden, Percival SL. Use of in vivo generated biofilms from hemodialysis catheters to test the efficacy of a novel antimicrobial catheter lock for biofilm eradication in vitro. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3073-6.
- [78] Ayres HM, Payne DN, Furr JR, Russell AD. Effect of permeabilizing agents on antibacterial activity against a simple *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Lett Appl Microbiol* 1998; 27: 79-82.
- [79] Banin E, Brady KM, Greenberg EP. Chelator-Induced Dispersal and Killing of *Pseudomonas aeruginosa* Cells in a Biofilm. *Appl Enviroment Microbiol* 2006; 72: (3): 2064-9.
- [80] Kierek K, PI. Watnick. The *Vibrio cholerae* O139 O-antigen polysaccharide is essential for Ca²⁺-dependent biofilm development in sea water. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 14357-62.
- [81] Huang J, KL. Pinder. Effect of calcium on development of anaerobic acidogenic biofilms. *Biotechnol Bioeng* 1995; 45: 212-8.
- [82] van der Plas MJA, Jukema GN, Wai SW, Heleen CM, Dogterom B. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrobial Chemother* 2008; 61: 117-22.
- [83] Mumcuoglu KY, Ingber A, Gilead L. Maggot therapy for the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 1998; 21: 2030-1.
- [84] Sherman RA. Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. *Diabetes Care* 2003; 26: 446-51.
- [85] Horobin AJ, Shakesheff KM, Pritchard DI. Promotion of human dermal fibroblast migration, matrix remodelling and modification of fibroblast morphology within a novel 3D model by *Lucilia sericata* larval secretions. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 1410-8.
- [86] Sigurdsson G, Fleming RMT, Heinken A, Thiele IA. Systems Biology Approach to Drug Targets in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm. *PLoS ONE* 2012; 7(4): e34337.
- [87] Palsson B. Systems biology: properties of reconstructed networks. Cambridge: Cambridge University Press. Xii. 2006; pp: 322.
- [88] Orth JD, Thiele I, Palsson BO. What is flux balance analysis? *Nat Biotechnol* 2010; 28: 245-8.
- [89] Feist AM, Palsson BO. The growing scope of applications of genome-scale metabolic reconstructions using *Escherichia coli*. *Nat Biotech* 2008; 26: 659-67.

- [90] Lee DS, Burd H, Liu J, Almaas E, Wiest O. Comparative genomescale metabolic reconstruction and flux balance analysis of multiple *Staphylococcus aureus* genomes identify novel antimicrobial drug targets. *J Bacteriol* 2009; 191: 4015-24.
- [91] Dunford C, Cooper R, Molan P. The use of honey in wound management. *Nurs Stand* 2000; 15: 63-8.
- [92] Brudzynski K. Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Can J Microbiol* 2006; 52: 1228-37.
- [93] Alandejani T, Marsan J, Ferris W, Slinger R, Chan F. Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Otolaryng Head and Neck Surg* 2009; 141: 114-8.
- [94] Kohler T, Perron GG, Buckling A, van Delden C. Quorum sensing inhibition selects for virulence and cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000883.
- [95] Rahmati S, Yang S, Davidson AL, Zechiedrich EL. Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. *Mol Microbiol* 2002; 43: 677-85.
- [96] Kiran S, Sharma P, Harjai K, Capalash N. Enzymatic quorum quenching increases antibiotic susceptibility of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran J Microbiol* 2011; 3 (1): 1-12.
- [97] Wolter J, Seeney S, Bell S, Bowler S, Masel P, McCormack J. Effect of longterm treatment with azithromycin on disease parameters in cystic fibrosis: a randomized trial. *Thorax* 2002; 57: 212-6.
- [98] Saiman L, Marshall BC, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Quittner AL, Cibene DA. Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003; 290: 1749-56.
- [99] Bjarnsholt T, Jensen PØ, Rasmussen TB, Christophersen L, Calun H, Hentzer M. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology* 2005; 151: 3873-80.
- [100] Kim J, Hahn JS, Franklin MJ, Stewart PS, Yoon J. Tolerance of dormant and active cells in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm to antimicrobial agents. *J Antimicrobial Chemother* 2009; 63: 129-35.
- [101] Richards LA. Spatial heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and how it affects antibiotic tolerance. PhD thesis, Montana State University, Bozeman, USA. 2006.
- [102] Walters MC, Roe F, Bugnicourt A. Contribution of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 317-23.
- [103] Hill D, Barbara R, Pajkos A. Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates

- derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5085-90.
- [104] Hoang TT, Kutchma AJ, Becher A, Schweizer HP. Integration proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* 2000; 43: 59-72.
- [105] Hassett DJ, Cuppoletti J, Trapnell B, Lyman SV, Rowe JJ, Yoon SS, et al. Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Adv. Drug Delivery Rev* 2002; 54: 1425-43.
- [106] Murray TS, Okegbe C, Gao Y, Kazmierczak BI, Motterlini R, et al. The carbon monoxide releasing molecule CORM-2 Attenuates *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm formation. *PLoS ONE* 2012; 7(4): e35499.
- [107] Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, Ochsner UA, Parvatiyar K, Kamani HL, et al. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell* 2002; 3: 593-603.
- [108] Barraud N, Hassett DJ, Hwang S, Rice SA, Kjelleberg S, Webb JS. Involvement of Nitric Oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2006; 188(21): 7344-53.
- [109] Firoved AM, Wood SR, Ornatowski W, Deretic V, Timmins GS. Microarray analysis and functional characterization of the nitrosative stress response in nonmucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2004; 186: 4046-50.
- [110] Motterlini R, Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Mann BE. Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities. *Circ Res* 2002; 90: E17-24.
- [111] Nobre LS, Seixas JD, Romão CC, Saraiva LM. Antimicrobial action of carbon monoxide-releasing compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 4303-7.
- [112] Davidge KS, Sanguinetti G, Yee CH, Cox AG, McLeod CW. Carbon monoxide-releasing antibacterial molecules target respiration and global transcriptional regulators. *J Biol Chem* 2009; 284: 4516-24.
- [113] Hanlon GW, Denyer SP, Olliff CJ, Ibrahim LJ. Reduction of exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 2746-53.
- [114] Hughes KA, Sutherland IW, Jones MV. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology* 1998; 144: 3039-47.
- [115] Curtin JJ, Donlan RM. Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by

- Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1268-75.
- [116] Cerca N, Oliveira R, Azeredo J. Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* planktonic cells and biofilms to the lytic action of *Staphylococcus* bacteriophage K. *Lett. Appl Microbiol* 2007; 45: 13-317.
- [117] Corbin BD, McLean RJC, Aron GM. Bacteriophage T4 multiplication in a glucose-limited *Escherichia coli* biofilm. *Can J Microbiol* 2001; 47: 680-4.
- [118] Fu W, Forster T, Mayer O, Curtin JJ, Lehman SM, Donlan RM. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an In Vitro model system. *Antimicrobial Agents and Chemother* 2010; 54(1): 397-404.

Biofilm of *Pseudomonas Aeruginosa* and New Preventive Measures and Anti- Biofilm Agents

R. Ghotaslou¹, B. Salahi Eshlaqghi²

Received: 04/08/2012

Sent for Revision: 11/11/2012

Received Revised Manuscript: 10/12/2012

Accepted: 17/12/2012

Background and Objective: Microbial biofilms are responsible for 65% of human infections, and are resistance to antibiotics. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important biofilm producing bacteria. This review tries to explain the last mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, the reasons for its resistance to antimicrobial agents, as well as new preventive measures and anti- biofilms agents.

Materials and Methods: In this review article, the information resources including Pub Med, Daneshyar network, DOAJ, ProQuest, Ovid, Elsevier Sciences, Google Scholar, and Integrated Digital Library were searched using pseudomonas biofilm, anti-biofilm and biofilm treatment as the key words.

Results: Routine antimicrobial treatments fail to eradicate biofilms. Because of the distinctive properties of biofilm, it requires a different treatment. Biofilms are important in drug resistance, therefore scientists are exploring appropriate ways to control and prevent biofilm formation.

Conclusion: In conclusion, surface modification and physical methods are techniques that prevent biofilm formation. Due to resistance of biofilm to current antibiotics, various unconventional treatments have been reported from around the world.

Key words: Biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, Anti- Biofilm agents

Funding: This study did not have any supported.

Conflict of interest:.. None declared

How to cite this article: Ghotaslou R, Salahi Eshlaqghi B. Biofilm of *Pseudomonas Aeruginosa* and New Preventive Measures and Anti- Biofilm Agents. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2013; 12(9): 747-68. [Farsi]

1- Associated Prof., Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
(Corresponding Author) Tel: (0411) 3364661, Fax: (0411) 3364661, E- mail: rzgottaslo@yahoo.com

2- MSc Student of Midwifery, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran