بیوفیلم

سد دفاعی باکتری در برابر عوامل ضد میکروبی

دکتر صدیقه فضلی بزاز ـ دکتر اسکندر مقیمی‌پور

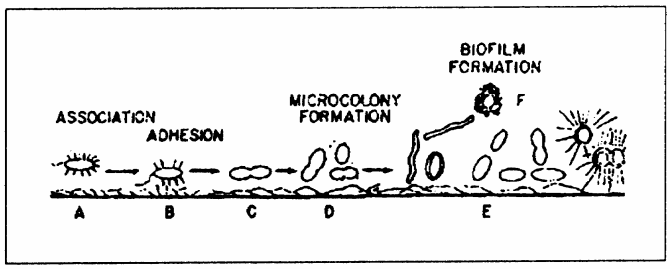
دانشکده داروسازی ـ دانشگاه علوم پزشکی مشهد

مقدمه

اگر میکربی در برابر حداقل دوز ممانعت کننده یک ماده ضد میکربی مقاومت نشان دهد و قابلیت رشد خود را همچنان حفظ نماید، به آن یک میکرب مقاوم می‌گویند. این مقاومت می‌تواند ذاتی[1] باشد، به این ترتیب که باکتری‌های گرم منفی در برابر کلرهگزیدین به طور ذاتی مقاومند و دارای غلظت مهار رشد بالاتری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت هستند. همچنین میکرب می‌تواند تحت شرایطی مقاومت را از محیط کسب نماید. مقاومت اکتسابی[2] در مواردی با تغییرات ژنتیک سلول میکرب همراه است ولی در برخی موارد دیگر فقط تغییرات فنوتیپ[3] سلول را به همراه دارد. تغییرات فنوتیپ می‌تواند منجر به تغییر در نفوذپذیری جداره خارجی سلول گردد. در نتیجه این عمل، عبور ماده ضد میکربی از خلال غشا با دشواری بیشتری صورت می‌گیرد و سلول زنده می‌ماند. شیوه دیگر مقاومت اکتسابی با منشأ فنوتیپ، تمرکز میکرب‌ها در یک زمینه با ماتریس[4] نسبتاً نفوذناپذیر است که به نام بیوفیلم[5] خوانده می‌شود. میکرب‌ها در بیوفیلم، در مقایسه با سلول‌های شناور پارویشی[6]، زندگی نهفته‌ای را می‌گذرانند ولی قادرند با تغییر شرایط دوباره به وضعیت اولیه خود بازگردند.

تعریف

بیوفیلم یکی از مکانیسم‌های مهم بقای سلول باکتریایی دراکوسیستم‌های طبیعی، بدن انسان و همچنین وسایل و ابزار مورد استفاده در صنعت و پزشکی است. به طور کلی باکتری‌های موجود در جمعیت‌های آبی تمایل بارزی جهت تداخل با سطوح دارند. منشأ این تداخل را آب‌گریزی سلول‌های باکتریایی دانسته‌اند. مطالعات اخیر نشان داده است که اتصال باکتری به سطح می‌تواند یک وضعیت گذرا باشد. به بیان دیگر باکتری‌ها به طور عمده به صورت برگشت‌پذیر و گاهی به صورت برگشت‌ناپذیر به سطح می‌چسبند که در حالت دوم تشکیل بیوفیلم چسبناک باکتریایی آغاز می‌گردد. سلول باکتری، روند برگشت‌ناپذیر چسبیدن به سطح را با استفاده از پلیمرهای اگزوپلی ساکاریدگلایکوکالیکس[7] انجام می‌دهد. سپس تقسیم سلولی منجر به تشکیل سلول‌های خواهر[8] می‌گردد. با افزایش تعداد سلول‌ها، میکروکلنی‌ها[9] به وجود می‌آیند و در نهایت



تصویر ۱ ـ مراحل تشکیل بیوفیلم؛ اتصال برگشت‌پذیر باکتری به سطح پلیمری (A)، اتصال برگشت‌ناپذیر باکتری به سطح پلیمری (B)، تقسیم سلولی (C)، تشکیل میکروکلنی (D)، جایگزینی درون بیوفیلم چسبنده (E) و تکثیر باکتری‌ها در فاز مایع (F)

تجمع این میکروکلنی‌ها، بیوفیلم را به وجود می‌آورد که باکتری‌ها قادرند در آن به تکثیر و تولیدمثل بپردازند (تصویر ۱). فضای بین میکروکلنی‌ها در بعضی موارد حاوی همان پلیمری است که در ماتریس فشرده میکروکلنی‌ها وجود دارد زیرا به طور مثال باکتری *سودوموناس‌ائروژینوزا*[10] فقط *الژینات* تولید می‌کند. در فضای بین میکروکلنی‌ها، کانال‌های آب وجود دارد که نفوذپذیری زیادی نسبت به آب دارند و وظیفه تحویل غذا از محیط مایع به میکروکلنی‌ها و خارج کردن محصولات متابولیک را بر عهده دارند.

فیزیولوژی بیوفیلم

بیوفیلم‌های تازه تک لایه هستند ولی با گذشت زمان، تعداد لایه‌ها افزایش می‌یابد. باکتری‌های بیوفیلم در یک ماتریس گلایکوکالیکس چگال احاطه شده‌اند. این ماتریس حاوی مقدار زیادی اگزوپلی ساکارید فیبری[11] هیدراته است که محتوای شیمیایی آن به گونه میکرب بستگی دارد. این پلی ساکارید حاوی یک یا چند یورونیک اسید[12] آنیونی می‌باشد. میکرب‌ها در ماتریس، توزیعی نسبتاً تصادفی و غیر یکنواخت دارند و میکروکلنی‌ها می‌توانند یکسان یا غیر یکسان باشند. باکتری‌های سطحی بیوفیلم اختلاف فیزیولوژیک زیادی با باکتری‌های عمقی دارند و با افزایش ضخامت بیوفیلم، این تفاوت بیشتر می‌گردد. سلول‌های عمقی به خاطر دسترسی کمتر به اکسیژن، از سرعت رشد کمتری برخوردارند و در نتیجه کوچکترند. این سلول‌ها در یک حالت نهفته به سر می‌برند و فقط زمانی که تعداد زیادی از سلول‌های سطحی بمیرند و یا بیوفیلم را ترک گویند، فعال می‌گردند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیوفیلم‌های کهنه در مقایسه با انواع جوانتر بیشتر است.

اهمیت باکتری‌های بیوفیلم در عفونت‌های بالینی

عفونت‌های بالینی شایع که حضور بیوفیلم در آن مشاهده شده است، بیشتر شامل عفونت‌های مزمن می‌باشد که از آن جمله

می‌توان استئومیلیت[13] و بیماری‌های مزمن باکتریایی پروستات، اندوکارد و ریه‌ها (فیبروز سیستیک[14]) را نام برد. وجود بیوفیلم، باکتری را از خطر حمله سیستم دفاعی بدن و عوامل سمی مانند آنتی بیوتیک‌ها حفظ می‌کند. بنابراین برای درمان چنین عفونت‌هایی ابتدا باید تأثیر آنتی‌بیوتیک را بر روی فیلم بررسی کرد. نتیجه این بررسی می‌تواند تا حد زیادی با نتایج کلاسیک حاصل از بررسی آنتی‌بیوتیک‌ها متفاوت باشد. در مرحله بعد باید دوز و فواصل تجویز دارو به دقت تعیین گردد و برای جلوگیری از بروز مقاومت، باید فقط از داروهای مناسب استفاده شود.

باکتری‌های موجود در بیوفیلم‌ها می‌توانند از طریق آلوده کردن ابزار مورد استفاده در بیمارستان‌ها و مراکز درمانی به بیمار منتقل گردیده و موجب بیماری شوند. به‌عنوان نمونه، در بررسی سرنگ‌های هوا - آب مورد استفاده در دندانپزشکی مشاهده گردید که پس از ۷ روز، باکتری‌ها در سطوح زیر دیواره جایگزین گردیده بود. این جایگزینی پس از ۳۰ روز به تشکیل میکروکلنی‌هایی منجر گردید که در آنها، باکتری‌ها در مواد پلیمری خارج سلولی نهفته شده بودند. پس از ۱۲۰ روز، اتصال و یکی شدن میکروکلنی‌ها آغاز شده و در نهایت پس از گذشت ۱۸۰ روز مخلوط ناهمگن و چند لایه میکروکلنی‌ها که همان بیوفیلم است، تشکیل می‌شود (جدول ۱).

کلنی‌های اولیه به طور عمده به‌وسیله گونه‌های سودوموناس[15] تشکیل شده بودند ولی نشانی از انواع پاستورلا[16]، موراکسلا[17]، اکروباکتریوم[18] و اثروموناس[19] نیز به چشم می‌خورد. در مراحل بعد انواع فلاوباکتریوم[20] واسینه باکتر[21] نیز مشاهده گردیدند.

جدول ۱ - جدول تغییرات تجمع باکتریایی در یک بیوفیلم تشکیل شده در سرنگ‌های هوا - آب مورد استفاده در دندانپزشکی

زمان	تغییر فلور بیوفیلم
۷ روز	جایگزینی انواع باکتری‌ها در سطوح زیر لوله‌ها
۳۰ روز	تشکیل میکروکلنی‌های مجزا در زمینه پلیمری خارج سلولی
۱۲۰ روز	شروع اتصال میکروکلنی‌ها
۱۸۰ روز	تشکیل مخلوط ناهمگن و چند لایه میکروکلنی‌ها (بیوفیلم)

درمان آنتی‌بیوتیکی و مکانیسم مقاومت

همان طور که گفته شد، مقاومت بیوفیلم‌های کهنه نسبت به انواع جوان بیشتر است و به همین علت، درمان آنتی‌بیوتیکی باید در بدو تشکیل بیوفیلم (یعنی در آغاز ابتلا به عفونت) انجام شود زیرا در غیر این صورت افزایش تعداد و ضخامت لایه‌ها سد نفوذناپذیری در برابر آنتی‌بیوتیک به وجود می‌آورد. در زمینه علت مقاومت فرضیه‌های مختلفی بیان شده است و مکانیسم پیشنهادی تا حد زیادی پیچیده است. علل مختلف ایجاد مقاومت را به این شرح برشمرده‌اند:

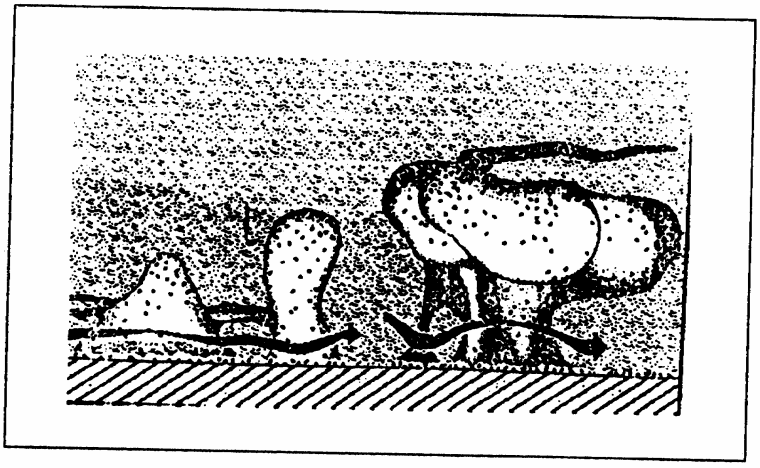
- اتصال آنتی‌بیوتیک به ماتریس گلایکوکالیکس و غیر فعال شدن آن
- تغییر توانایی آنتی‌بیوتیک برای عبور از پوشش سلولی
- تولید آنزیم‌های تخریب کننده آنتی‌بیوتیک‌ها
- تعدیل اهداف ملکولی به نحوی که حساسیت کمتری نسبت به حمله آنتی‌بیوتیکی داشته‌باشند.
- انتقال پلاسمیدهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی (این زمینه نیاز به تحقیقات گسترده‌تری دارد).

ارزیابی و بررسی بیوفیلم

عمده‌ترین روش‌هایی که برای بررسی بیوفیلم مورد استفاده قرار گرفته است، روش شمارش کلنی[۲۲] و SEM[۲۳] می‌باشد. این روش‌ها به دلیل خارج ساختن باکتری‌های بیوفیلم از محیط اصلی خود و بررسی آنها در شرایطی نامتناسب با شرایط بیوفیلم، از کارآیی کیفی بالایی برخوردار نیستند. روش دیگری که به تازگی به‌کار گرفته شده است، روش CSLM[۲۴] است که با بکارگیری آن قادرند بیوفیلم را به صورت دست نخورده مورد بررسی قرار دهند. خصوصیات مرفولوژیک بیوفیلم از جمله همگنی میکروکلنی‌ها، تفاوت چگالی ماتریس‌ها، نفوذپذیری کانال‌های آب و ویژگی‌های دیگری از بیوفیلم با استفاده از CSLM آشکار گردیده است. از تکنیک‌های دیگر آنالیز هم می‌توان برای بررسی بیوفیلم استفاده کرد. به‌عنوان مثال می‌توان از بکارگیری رزونانس مغناطیسی هسته (NMR) برای بررسی الگوهای جریان در کانال‌های آب موجود در بیوفیلم نام برد (تصویر ۲).

روش‌های زدودن بیوفیلم از دیواره سطوح

این روش‌ها برحسب نوع سطح و محیط در بر گیرنده آن، تا حد زیادی با هم تفاوت دارند. در یک بررسی، ۳ روش ایجاد گرداب[۲۵]، استفاده از ماوراء صوت[۲۶] و تکان دادن با دانه[۲۷] درزدودن بیوفیلم حاصل از باسیلوس سوبتیلیس[۲۸] وسودومونافلورسنس[۲۹] از سطوح فولادضد زنگ[۳۰] وپلی‌یورتان[۳۱] مورد بررسی قرار گرفت و کارآیی آنها مقایسه گردید. در این بررسی مقایسه روش‌ها با استفاده از شمارش کلنی‌ها و روش SEM انجام شد و نتیجه گرفتند که از نظر تعداد باکتریهای باقیمانده، هیچگونه تفاوت معنی داری بین آنها وجود ندارد. البته با استفاده از



تصویر ۲ ـ نمایش فرضی ساختمان بیوفیلم باکتریایی که با استفاده از بررسی CSLM تعداد زیادی بیوفیلم طراحی شده است. فلش‌ها بیانگر جریان همرفتی از خلال کانال‌های آب است.

SEM نشان داده شده که روش تکان دادن با دانه، خیلی بهتر از دو روش دیگر قادر به زدودن باقیمانده‌های مواد پلیمری خارج سلولی از هر دو سطح مورد آزمایش می‌باشد. در پایان این تحقیق پیشنهاد شده است که جهت زدودن بیوفیلم از دیواره سطوح به نحوی که باکتری‌ها به صورت دست نخورده و سالم جدا گردند، روش تکان دادن با دانه از روش‌های دیگر مناسب‌تر است.

نتیجه‌گیری

حضور باکتریهای مقاوم همواره محدودیت‌هایی در درمان آنتی‌بیوتیکی به‌وجود می‌آورد؛ به نحوی که دوزاژ و فواصل پذیرفته شده تجویز دارو دیگر کارآیی لازم برای مقابله با باکتری را نخواهد داشت. مطالعه بیوفیلم به‌عنوان یکی از راه‌های مقاومت میکربی می‌تواند از این جهت دارای اهمیت باشد. مطالعه فلور میکربی بیوفیلم‌های موجود در طبیعت و یا بیوفیلم‌هایی که بر سطوح مجراهای طبی یا صنعتی رشد می‌کنند، بررسی روند تشکیل و دینامیک بیوفیلم‌ها و تعیین تأثیر عوامل مختلف از جمله دما، pH، الکترولیت‌ها و شرایط تغذیه و محیط کشت بر روی روند تشکیل آنها می‌تواند تأثیر قابل توجهی در زمینه غلبه بر این نوع مقاومت داشته باشد.

زیرنویس:

1. intrinsic resistance
2. acquired resistance
3. phenotype
4. matrix
5. biofilm
6. planctonic or growing cells
7. exopolysaccharide glycocalyx polymers
8. sister cells
9. microcolonies
10. Pseudomonas aeruginosa
11. fibrous
12. uronic acid
13. osteomyelitis
14. cystic fibrosis
15. Pseudomonas spp.
16. Pasteurella spp.
17. Moraxella spp.
18. Ochrobacterium spp.
19. Aeromonas spp.
20. Flavobacterium spp.
21. Acinebacter spp.
22. colony Count
23. Scanning Electron Microscopy
24. Confocal Scanning Laser Microscopy
25. vortexing
26. sonication
27. shaking with beeds
28. Bacillus subtillis
29. Pseudomonas fluorescence
30. stainless steel
31. polyuretan

منابع:

1. Costerton J. W. et al. "Bacterial biofilms in nature and disease" Ann. Rev. Microbiol. 1987, 41: 435 - 464
2. Anwar H., Costerton J. W. "Effective use of antibiotics in the treatment of biofilm - associated infections" AMS News, 1992, vol 58, No. 12
3. Costerton J. W., et al. "Minireview: Biofilms, the customized micriniche" J. Bacteriol. 1994, 2137 - 2142
4. Tall B. D. et al. "Bacterial succession within a biofilm in water supply lines of dental air - water syringes" Can. J. Microbiol., 1995, 41: 647 - 654
5. Lindsay D. and Von Holy A. "Evaiuation of dislodging methods for laboratory - grown bacterial biofilms" Food Microbiology, 1997, 14: 383 - 390
6. Jones K., Bradshow S.B. "Biofilm formation by the enterobacteriaceae" J. App. Bacteriol., 1996, 80: 458 - 464