Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 29, No.3, Autumn 2019 **ORIGINAL ARTICLE**

The effect of bromhexine, gentamicin and imipenem on biofilm of standard bacterial *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* by ELISA method

Mohamad Hamzeie[1], Bizhan Nomanpour[2], Abbas Akhavansepahy[3]
[1]MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Life Sciences, Islamic Azad University-Tehran North of Branch, Tehran, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
[3] Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Life Sciences, Islamic Azad University-Tehran North of Branch, Tehran, Iran

Abstract

Background: Biofilms are a collection of microorganisms that have the ability to stick to different levels. Due to the difficulty of treatment of bacterial biofilm infections and their lack of recognition by conventional diagnostic methods, this study aimed to provide a new method of identification and the effect of related drugs on *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms.
Materials and methods: In this study, two strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were used. Using the microplate method, gentamicin and imipenem combined with bromhexine and also bromhexine alone with different dilutions were used on the biofilm of these bacteria. Then results read out using ELISA reader.
Results: Bromhexine alone and without combining with other substances or types of antibiotics had a positive effect on preventing the formation of biofilms and bacterial adhesion, and reduced *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* in the biofilm.
Conclusion: Biofilm has been able to grow significantly, despite the use of strong antibiotics such as imipenem and gentamicin. Its existence in the body, or devices such as urethral catheters, cardiac artificial valves or other artificial organs, causes a significant disorder within immune system.
Keywords: *Biofilm, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Bromhexine, ELISA.*

Cited as: Hamzeie M, Nomanpour B, Akhavansepahy A. The effect of bromhexine, gentamicin and imipenem on biofilm of standard bacterial *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* by ELISA method. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2019; 29(3): **216-221.**

Correspondence to: Bizhan Nomanpour
Tel: *+9120413083*
E-mail: bijann1397@yahoo.com
ORCID ID: 0000 0002 8813 5959
Received: 20 Nov 2018; **Accepted:** 5 Dec 2018

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۹، شماره ۳، پاییز ۹۸، صفحات ۲۱۶ تا ۲۲۱

Original Article

بررسی تأثیر داروهای برم هگزین، جنتامایسین و ایمی‌پنم روی بیوفیلم باکتریایی استاندارد *اشرشیا کلای* و *سودوموناس آئروژینوزا* به روش الایزا

محمد حمزئی[۱]، *بیژن نعمان پور*[۲]، عباس اخوان سپهی[۳]

[۱] کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی ،دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
[۲]استادیار میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
[۳]دانشیار، گروه میکروبیولوژی ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال ، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *: بیو فیلم‌ها اجتماعی از میکروارگانیسم هستند که توانایی چسبیدن به سطوح مختلف را دارند. با توجه به مشکل بودن درمان عفونت‌های بیوفیلم باکتریایی و عدم تشخیص آنها با روش‌های مرسوم تشخیصی، این تحقیق با هدف ارائه روش شناسایی جدید و اثر داروهای مربوطه بر روی بیوفیلم‌های سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلای صورت گرفت.*

روش بررسی: *در این تحقیق از دو سوش استاندارد اشرشیاکلای و سودوموناس آئروژینوزا استفاده شد. با به کارگیری از روش میکروپلیت، آنتی بیوتیک جنتامایسین و ایمیپنم به صورت ترکیبی با برم هگزین و نیز برم هگزین به تنهایی با رقت‌های مختلف بر روی بیوفیلم این باکتری‌ها اثر داده شدند. سپس با استفاده از الایزا ریدر خوانش صورت گرفت.*

یافته‌ها: *برم هگزین به تنهایی و بدون ترکیب با ماده دیگر یا انواع آنتی بیوتیک‌ها تأثیر مثبت در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم و چسبندگی باکتری داشت و در باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیا کلای کاهش بیوفیلم را در پی داشت.*

نتیجه‌گیری: *علی رغم استفاده از آنتی بیوتیک‌های قوی نظیر ایمی‌پنم و جنتامایسین، بیوفیلم باز هم می‌تواند رشد قابل توجهی داشته باشد. حضور آن در بدن شخص، یا وسایلی از قبیل سوندهای ادراری یا دریچه‌های مصنوعی، و یا دیگر اعضا پیوندی مصنوعی، باعث ایجاد اختلال در سیستم ایمنی بدن می‌شود.*

واژگان کلیدی: *بیوفیلم، اشرشیاکلای، سودوموناس آئروژینوزا، برم هگزین، الایزا.*

مقدمه

بیوفیلم‌ها جمعیت میکروبی متراکمی هستند که به سطوح جامد و یا سطوح بافتی احاطه شده توسط پوشش پلی‌ساکاریدی متصل می‌شوند. قدمت بیوفیلم به ۲/۸ میلیارد سال قبل، یعنی درست زمانی که حیات بر روی کره زمین آغاز شد برمی‌گردد (۱). بیوفیلم‌ها قادر هستند بر روی سطوح زنده و غیرزنده تشکیل شوند. ازجمله تأثیرات مخرب بیوفیلم‌ها ایجاد عفونت در بیمارستان‌ها است. عامل انواع مختلفی از عفونت‌های میکروبی در بدن هستند که به‌طور تخمینی ۸۰٪ این عفونت‌ها را شامل می‌شوند. از جمله عفونت‌های به وجود آمده توسط بیوفیلم‌ها می‌توان به عفونت‌های واژن، دستگاه ادراری، گوش میانی و پلاک دندان اشاره کرد (۲). باکتری‌های مختلفی توانایی ایجاد بیوفیلم را دارند که ازجمله آنها می‌توان به سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلای، لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوک‌ها و با سیلوس‌ها اشاره کرد (۱, ۲).

بیوفیلم‌ها می‌توانند از یک گونه باشند یا مخلوطی از چندگونه که در سال ۱۹۷۸ توسط کاسترتون در مورد باکتری‌ها شرح داده شدند (۳). در شرایط استرس سبب چسبیدن باکتری‌ها

آدرس نویسنده مسئول: کرمانشاه، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه ، بیژن نعمان پور
(**email**: bijann1397@yahoo.com)
ORCID ID: 0000 0002 8813 5959
تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۸/۲۹
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۷/۹/۱۴

به سطوح مختلف می‌شوند و اصولاً باکتری‌ها با تشکیل بیوفیلم سبب مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی، مقاومت در برابر سیستم ایمنی میزبان و سبب حفظ شرایط فیزیکی و شیمیایی مناسب برای رشد می‌شوند و این امر سبب مقاومت بیوفیلم‌ها در شرایط نامساعد می‌شود. در ضمن روابط هم‌یاری بین باکتری‌ها و بیوفیلم در مقاومت آن‌ها در مقابل شرایط نامساعد مؤثراست (۴). گستردگی بیوفیلم‌ها بر روی هر نوع سطحی که میکروارگانیسم‌ها وجود دارند، امکان‌پذیر است و در همه محیط‌های آبی نیز دیده می‌شوند که در شرایط گوناگون دارای نقش اتصالی هستند (۴-۲).

اشرشیاکلای شایع‌ترین و مهم‌ترین جنس در خانواده انتروباکتریاسه است که در پزشکی اهمیت دارد. باکتری بی هوازی اختیاری و بخشی از فلور فیزیولوژی روده‌ای در انسان و حیوانات خونگرم است. اما برخی از سویه‌های این باکتری سبب ایجاد بیماری‌هایی مانند پنومونی، گاستروانتریت، عفونت‌های ادراری - تناسلی و سپتی‌سمی می‌شوند (۵). سودوموناس آئروژینوزا باسیل گرم منفی و هوازی اجباری است و به راحتی بر روی انواع مختلفی از محیط‌های کشت، رشد می‌کند. برخی از سویه‌های این باکتری خون را همولیز می‌کنند. سودوموناس آئروژینوزا کلنی‌هایی صاف و گرد همراه با فلورسانس سبز ایجاد می‌کند. این باکتری به شکل گسترده‌ای در طبیعت پراکنده شده و به‌طورمعمول در محیط‌های مرطوب بیمارستانی یافت می‌شود. بیوفیلم‌های ایجاد شده توسط اشرشیاکلای وسودوموناس آئروژینوزا مشکلات شدیدی در بیمارانی مانند فیبروز کیستیک ایجاد می‌کنند (۵, ۶). برم‌هگزین به صورت دارو عموماً برای خلط آوری و رقیق‌کننده ترشحات موکوسی استفاده می‌شود. همچنین برای درمان سرفه که بر اثر تب، برونشیت، بیماری انسدادی مزمن ریوی یا فیبروز کیستیک مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷). ایمی‌پنم درگروه کاربا‌پنم‌ها قرار می‌گیرد و می‌تواند بر روی بسیاری از باسیل‌های گرم منفی، باکتری‌های گرم مثبت و بی‌هوازی‌ها مؤثر باشد (۸). جنتامایسین از جمله آنتی بیوتیک‌هایی است که در خانواده آمینوگلیکوزیدها جای می‌گیرد و بر روی سنتز پروتئین در باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت اختلال ایجاد می‌کند (۹). هدف این مطالعه بررسی اثر ترکیب برم‌هگزین و ایمیپنم و جنتامایسین بر روی تشکیل بیوفیلم است.

مواد و روشها

جمع آوری سویه‌های استاندارد باکتریایی

باکتری‌های استاندارد سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلای از گروه باکتری شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران تهیه شدند و بر روی محیط مولر هینتون آگار و ائوزین متیلن بلو آگار کشت داده شدند.

تولید بیوفیلم با استفاده از روش میکروپلیت

ابتدا از روی محیط جامد، یک کلنی ۲۴- ۱۸ ساعته برداشتیم و به لوله محتوی محیط LB اضافه کردیم و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در گرمخانه قرار دادیم. پس از پایان گرمخانه گذاری خوانش غلظت آن با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر بین ۰/۸ تا ۰/۱ (غلظت نیم مک فارلند) صورت گرفت. در ادامه سوپانسیون میکروبی آماده در طول موج تعیین شده به میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای منتقل شد. بدین صورت که در داخل هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی اضافه و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد.

سنجش تولید بیوفیلم

بعد از گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت به منظور سنجش مقدار تولید بیوفیلم در هر چاهک، در ابتدا محتویات میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی کاملاً خالی شد و با استفاده از آب مقطر شستشو داده شدند. پس از شست‌وشو، هر چاهک با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۱ درصد برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رنگ‌آمیزی و سپس با استفاده از آب مقطر سه بار شست‌وشو داده شدند. میکروپلیت‌ها را چندین دقیقه در دمای اتاق گذاشته تا خشک شدند. در مرحله آخر، ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ ٪ به هر چاهک اضافه شد. سپس جذب نوری ۴۹۲ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری شد. مقادیر جذب نوری به‌عنوان شاخص اتصال باکتری‌ها به سطح و تشکیل بیوفیلم در نظر گرفته شد.

آزمون تعیین MIC

جهت انجام تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC) از روش ماکرودایلوشن براث و تهیه کشت ۲۴ ساعته باکتری بر روی میحط مولر هینتون آگار رقت باکتری به اندازه نیم مک فارلند $1/5 \times 10^8$ cfu به دست امد. این رقت از باکتری برحسب استاندارد انستیتو آزمایشگاه و بالین (CLSI)، ۳۰۰ برابر رقیق شد تا به رقت 5×10^6 cfu رسید. ۰/۱ml از این سوسپانسیون برداشته شد و در چاهک به حجم ۰/۲ml برده شد و به غلظت $2/5 \times 10^5$ cfu رسید که تقریباً بر اساس استاندارد CLSI بود. حداقل غلظت ممانعت از رشد برای باکتری اشرشیاکلای برحسب آنتی بیوتیک ایمی‌پنم MIC≥۴، MIC=۲ و MIC ≥۱ بود که به ترتیب به‌عنوان میکروارگانیسم‌های مقاوم و نیمه حساس و

حساس تلقی شد و برحسب آنتی بیوتیک جنتامایسین مقدار MIC≥۱۶، MIC=۸ و MIC≤۴ بود که به ترتیب به‌عنوان میکروارگانیسم‌های مقاوم و نیمه حساس و حساس تلقی شد. برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا برحسب آنتی بیوتیک ایمیپنم مقدار MIC≥۸، MIC=۴ وMIC≤۲ به ترتیب به‌عنوان میکروارگانیسم‌های مقاوم، نیمه حساس و حساس تلقی شد و برحسب آنتی بیوتیک جنتامایسین MIC≥۱۶، MIC=۸ و MIC ≤۴ به ترتیب به عنوان میکروارگانیسم‌های مقاوم و نیمه حساس و حساس تلقی شد.

نتایج حاصل از مطالعه به کمک نرم افزار SPSS ویرایش ۲۱ مورد تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

در باکتری اشرشیاکلای میانگین تولید بیوفیلم در ردیف مربوط به سوسپانسیون باکتری ۰/۳µg/ml، در ردیف مربوط به آمبرکسول ۰/۱۷µg/ml، در ردیف مربوط به آمبرکسول و ایمیپنم ۰/۱۷µg/ml و در ردیف آمبرکسول و جنتامایسین ۰/۲۲µg/ml بود. بنابراین با توجه به این نتایج، ترکیب ایمیپنم با آمبرکسول و آمبرکسول به تنهایی تقریبا به یک اندازه بیوفیلم را کاهش دادند. ترکیب آمبرکسول با جنتامایسین بر روی پایین آوردن بیوفیلم نسبت به خود آمبرکسول تاثیر چندانی نداشت. بالاترین غلظت آمبرکسول ۳/۷۵ میکروگرم در هر میلی لیتر و بالاترین غلظت ایمیپنم ۳۲ و جنتامایسن ۱۲۸ میکروگرم در هر میلی لیتر بود و هر کدام تا ۱۲ رقت پایین‌تر هم موثر بودند (جدول ۱). در باکتری سودوموناس آئروژینوزا میانگین تولید بیوفیلم در ستون مربوط به سوسپانسیون باکتری ۰/۴µg/ml، در ستون مربوط به آمبرکسول ۰/۲۸µg/ml، در ستون مربوط به آمبرکسول و ایمیپنم ۰/۲µg/ml و در ستون مربوط به آمبرکسول و جنتامایسین ۰/۲۴µg/ml بود. بنابراین با توجه به این نتایج، ترکیب ایمیپنم با آمبرکسول بیشتر از آمبرکسول به تنهایی و ترکیب آمبرکسول با جنتامایسین برروی پایین آوردن بیوفیلم تاثیر داشتند. بالاترین غلظت آمبرکسول ۳/۷۵ میکروگرم در هر میلی لیتر و بالاترین غلظت ایمیپنم ۳۲ و جنتامایسین ۱۲۸ میکروگرم در هر میلی لیتر بود و هر کدام تا ۱۲ رقت پایین‌تر هم موثر بودند (جدول ۲).

بحث

اهمیت بیوفیلم‌ها در جوامع امروزی به حدی است که در حوزه پزشکی و تجهیزات مربوطه و همچنین در صنعت مواد غذایی معضلی شده است و سالانه هزینه‌های بسیار زیادی برای پژوهش در زمینه از بین بردن و جلوگیری از تشکیل بیوفیلم‌ها اختصاص داده می‌شود (۱۰). با توجه به نتایج مطالعات مختلفی که درزمینه بیوفیلم و مقاومت‌های دارویی و استفاده از انواع عصاره‌ها انجام شده است، مشاهده شده است که استفاده از آنتی بیوتیک‌های مختلف به‌تنهایی تاثیر به سزایی بر روی بیوفیلم‌ها ندارد و پژوهشگران را به سمت استفاده از داروهای ترکیبی با انواع آنتی بیوتیک‌ها برای حاصل شدن نتیجه بهتر در درمان این ساختارهای مقاوم سوق می‌دهد (۱۱).

جدول ۱. داده‌های اندازه گیری شده توسط الایزا در رقت‌های مختلف در باکتری اشرشیا کلای

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
سوسپانسیون باکتری	۰/۳۳۱	۰/۳۴۳	۰/۳۱۱	۰/۳۵۶	۰/۲۴۱	۰/۳۸	۰/۳۵۵	۰/۳۳۲	۰/۲۸۳	۰/۳۵۴	۰/۳۷۳	۰/۳۳۹
آمبرکسول	۰/۲۱۴	۰/۱۳۳	۰/۱۳۵	۰/۱۳	۰/۱۳۳	۰/۱۳۵	۰/۱۵۵	۰/۱۲۶	۰/۱۸۷	۰/۲۴۶	۰/۲۵۳	۰/۲۷۳
ایمیپنم+آمبرکسول	۰/۰۹۳	۰/۰۸۵	۰/۰۶	۰/۱۳۶	۰/۱۴	۰/۱۳۷	۰/۲۱۱	۰/۲۵۶	۰/۲۴۷	۰/۲۴	۰/۲۵۸	۰/۲۷۳
جنتامایسین +آمبرکسول	۰/۲۰۲	۰/۱۶۵	۰/۲۳۵	۰/۲۵۳	۰/۱۳۷	۰/۱۴۳	۰/۱۸۷	۰/۲۲۱	۰/۱۷	۰/۲۴۱	۰/۳۰۳	۰/۳۹۸

جدول ۲. داده‌های اندازه گیری شده توسط الایزا در رقت‌های مختلف در باکتری سودوموناس آئروژینوزا

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
سوسپانسیون باکتری	۰/۳۴۶	۰/۳۳۹	۰/۲۰۶	۰/۲۶۷	۰/۴۵۳	۰/۳۷۵	۰/۴	۰/۳۹	۰/۳۳۷	۰/۵۲	۰/۵۳۱	۰/۷۱۲
آمبرکسول	۰/۲۴۹	۰/۲۲۴	۰/۲۰۹	۰/۱۳۸	۰/۲	۰/۴۹۴	۰/۳۳۵	۰/۳۱۷	۰/۲	۰/۲۸۴	۰/۳۴۷	۰/۴۱
ایمیپنم+آمبرکسول	۰/۱۱۲	۰/۰۹۴	۰/۰۷۹	۰/۱۲۷	۰/۱۳۸	۰/۲۴۲	۰/۲۰۹	۰/۲۴۷	۰/۲۰۶	۰/۳۵۳	۰/۳۱۱	۰/۳۸۴
جنتامایسین +آمبرکسول	۰/۲۰۴	۰/۱۳۴	۰/۲۲۹	۰/۲۶۳	۰/۱۹۴	۰/۲۱۸	۰/۱۸۵	۰/۲۳۹	۰/۲۳۰	۰/۳۲۵	۰/۳۷۶	۰/۳۷۶

در مطالعه لوو وهمکارانش، در بررسی اثر برم‌هگزین و آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بر روی باکتری‌ها به خصوص سودوموناس آئروژینوزا با روش‌های کشت، اندازه‌گیری ضریب جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر و انجام اسکن لیزری میکرو گراف، به‌خوبی تأثیر مثبت برم‌هگزین و سیپروفلوکساسین در کاهش چسبندگی باکتری به خصوص در گونه وحشی سودوموناس نشان داده شد (۱۲). نتایج این مطالعه مشابه با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر است. برم‌هگزین با ترکیب با آنتی بیوتیک جنتامایسین و ایمی‌پنم باعث کاهش تولید بیوفیلم توسط باکتری سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلای شد و نیز برم‌هگزین به تنهایی و بدون ترکیب با ماده دیگر یا انواع آنتی بیوتیک‌ها مثل جنتامایسین و ایمی‌پنم باز هم تأثیر مثبت در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم و چسبندگی باکتری‌ها داشت.

از برم‌هگزین علاوه بر جلوگیری از تشکیل بیوفیلم یا کاهش آن بر روی انواع باکتری‌ها، می‌توان برای از بین بردن بیوفیلمهای غیر باکتریایی نظیر قارچها که در زمینه تولید بیوفیلم بسیار قوی و مقاوم هستند، استفاده کرد. طبق تحقیقات انجام شده توسط گیوانا پالکرانو و همکارانش بر روی بیوفیلم قارچ، برم‌هگزین در بیان ژن‌های درگیر در مکانیزم‌های مقاومت آزول و افزایش توان داروی ضد قارچی ترکیب شده با برم‌هگزین توان مقابله با بیوفیلم قارچی مانند کاندیدا پاراسیلوبیس را بالاتر برده است. این آزمایش در قیاس با آزمایش ما نشان داده است که برم‌هگزین نه تنها در برابر تجمع بیوفیلم در باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلای اثر مفید دارد، بلکه قابلیت مقابله با بیوفیلم‌های بیماری‌زای سایر میکروارگانیسم‌ها از قبیل قارچها را نیز دارد و با آزمایش انجام شده توسط ما همخوانی دارد (۱۶-۱۳). داروهای جدیدی که با برم‌هگزین ترکیب شده‌اند، دور نمای جدیدی را برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم که به صورت روزافزون درحال افزایش بر روی سطح تجهیزات و دستگاه‌های پزشکی است را نشان می‌دهد.

تحقیقات مختلفی نشان می‌دهند که عملکرد مثبت برم‌هگزین در بافت‌ها به‌خوبی محیط است و می‌توان با بیوفیلم در محیط‌های پیچیده داخل بدن یا بافت‌هایی مانند ریه انسان یا رت مقابله کرد (۱۵-۱۳).

به دلیل مثبت بودن آزمایش‌های متعدد و نتایجی که از مطالعه ما به دست آمد، به‌خوبی قابلیت ضد بیوفیلمی برم‌هگزین در باکتری‌های اشرشیاکلای و سودوموناس آئروژینوزا مشاهده شد. بنابراین می‌توان از این ماده برای بیوفیلم‌های قارچی که بسیار در زمینه تولید بیوفیلم و آلودگی ناشی از آن قدرتمند هستند و در برابر از بین رفتن مقاومت می‌کنند استفاده کرد (۱۵, ۱۷). عباس و همکارانش که بر روی توانایی برم‌هگزین در مسدود کردن حرکات تجمعی بیوفیلم پروتئوس میرابیلیس (*Proteus mirabilis*) جداشده از زخم پای بیماران دیابتی بررسی کرده بودند، نشان دادند که داروی برم‌هگزین برای جلوگیری از تجمع و حرکت بیوفیلم این باکتری در رقت‌های ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸ و ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر موثر است. در آزمایش انجام شده توسط ما نیز اثر برم-هگزین در رقت‌های ذکر شده باعث کاهش در تجمع بیوفیلم باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلای شد و همسو بودن با نتایج آزمایش ما را در پی داشت (۱۸). هم چنین بر طبق مطالعه‌ای که کاتالدی و همکارانش بر روی تاثیر متابولیت‌های برم‌هگزین در کودکان مبتلا به عارضه تنفسی انجام دادند، تاثیر مثبت این دارو در درمان خلط ناشی از عفونت تنفسی مشاهده شد (۱۹).

در نتیجه، تحقیقات باید بیشتر به مبحث بیوفیلم‌ها که عمدتا توسط باکتری‌ها و قارچ‌های گوناگونی که توانایی تولید آن را دارند بپردازند (۲۰). همچنین با توجه به نتایج این مطالعه توصیه می‌شود که از ترکیبات غیر آنتی‌بیوتیکی جدید یا ترکیب داروهای ضد بیوفیلم مانند برم‌هگزین با آنتی بیوتیکها برای کاهش مقاومت آنتی بیوتیکی که این روزها مشکل مبارزه با بیوفیلم‌های باکتریایی را دو چندان کرده است، استفاده شود و بدین وسیله از هزینه‌هایی که سالانه برای درمان و از بین بردن انواع این بیوفیلم‌ها و باکتری‌های ایجاد کننده بیماری متحمل می‌شود را کاهش داد و راه حل بهتری را برای بیماران جهت درمان ترسیم کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح پژوهشی محمد حمزئی دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی است و با پشتیبانی مالی و اداری معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال انجام شد که مولفین تشکر و سپاسگزاری از مرکز تحقیقاتی مزبور و مسئولین آن را وظیفه اخلاقی و علمی خود می‌دانند.

REFERENCES

1. Moser C, Pedersen HT, Lerche CJ, Kolpen M, Line L, Thomsen K, et al. Biofilms and host response–helpful or harmful. APMIS 2017;125:320-38.

2. Abedon ST. Ecology of anti-biofilm agents II: bacteriophage exploitation and biocontrol of biofilm bacteria. Pharmaceuticals 2015;8:559-89.

3. Ghannoum M, O'Toole GA, Eds. Microbial biofilms. New York: ASM Press; 2004.

4. López D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010;2:a000398.

5. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA, Eds. Jawetz, Melnick and Adelberg's medical microbiology. 25th edition. Philadelphia: McGraw-Hill Companies; 2006.

6. Pawar V, Komor U, Kasnitz N, Bielecki P, Pils MC, Gocht B, et al. In Vivo Efficacy of Antimicrobials against Biofilm-Producing Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 2015;59:4974-81.

7. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microb 2004;2:95-108.

8. Kropp H, Gerckens L, Sundelof JG, Kahan FM. Antibacterial activity of imipenem: the first thienamycin antibiotic. Rev Infect Dis 1985;7:S389-S410.

9. Chen C, Chen Y, Wu P, Chen B. Update on new medicinal applications of gentamicin: evidence-based review. J Formos Med Assoc 2014;113:72-82.

10. Hall CW, Mah T-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev 2017;41:276-301.

11. Trancassini M, Iebba V, Citerà N, Tuccio V, Magni A, Varesi P, et al. Outbreak of Achromobacter xylosoxidans in an Italian Cystic fibrosis center: genome variability, biofilm production, antibiotic resistance, and motility in isolated strains. Front Microbiol 2014;5:138.

12. Lu Q, Yu J, Yang X, Wang J, Wang L, Lin Y, et al. Ambroxol interferes with Pseudomonas aeruginosa quorum sensing. Int J Antimicrob Agents 2010;36:211-5.

13. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, et al. Critical review on biofilm methods. Crit Rev Microbiol 2017;43:313-51.

14. Borghi E, Borgo F, Morace G. Fungal Biofilms: Update on Resistance. Adv Exp Med Biol 2016;931:37-47.

15. Syed M, Chopra R, Shrivastava V, Sachdev V. Comparative evaluation of 0.2% Chlorhexidine Mouthwash, Xylitol Chewing Gum, and Combination of 0.2% Chlorhexidine Mouthwash and Xylitol Chewing Gum on Salivary Streptococcus mutans and Biofilm Levels in 8- to 12-Year-Old Children. Int J Clin Pediatr Dent 2016;9:313-319.

16. Pulcrano G, Panellis D, De Domenico G, Rossano F, Catania MR. Ambroxol influences voriconazole resistance of Candida parapsilosis biofilm. FEMS Yeast Res 2012;12:430-8.

17. Junior JCEM. Effectiveness of oral antiseptics on tooth biofilm: a study in vivo. J Contemp Dent Pract 2015;16:674-8.

18. Abbas HA. Ambroxol blocks swarming and swimming motilities and inhibits biofilm formation by *Proteus mirabilis* isolated from diabetic foot infection. Asian J Pharm Technol 2013;3:109-16.

19. Cataldi M, Sblendorio V, Leo A, Piazza O. Biofilm-dependent airway infections: a role for ambroxol? Pulm Pharmacol Ther 2014;28:98-108.

20. Nett JE, R Andes D. Fungal biofilms: In vivo models for discovery of anti-biofilm drugs. Microbiol Spectr 2015;3:E30.