

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

Mohamad Hamzeie¹, Bizhan Nomanpour², Abbas Akhavansepahy³

¹MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Life Sciences, Islamic Azad University-Tehran North of Branch, Tehran, Iran

²Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

³Associate 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

بررسی تأثیر داروهای برم هگزین، جنتامایسین و ایمپنم روی بیوفیلیم 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: بیوفیلیم‌ها اجتماعی از میکروارگانیسم هستند که توانایی چسبیدن به سطوح مختلف را دارند. با توجه به مشکل بودن درمان عفونت‌های بیوفیلیم باکتریایی و عدم تشخیص آنها با روش‌های مرسوم تشخیصی، این تحقیق با هدف ارائه روش شناسایی جدید و اثر داروهای مربوطه بر روی بیوفیلیم‌های 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 ایمپنم به صورت ترکیبی با برم هگزین و نیز برم هگزین به تنهایی با رقت‌های مختلف بر روی بیوفیلیم 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 بیوفیلیم و چسبندگی باکتری داشت و در باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیا کلای کاهش بیوفیلیم را در پی داشت.

نتیجه‌گیری: علی‌رغم استفاده از آنتی بیوتیک‌های قوی نظیر ایمپنم و جنتامایسین، بیوفیلیم 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: بیوفیلیم، اشرشیاکلای، سودوموناس آئروژینوزا، برم هگزین، الایزا.

مقدمه

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 بیوفیلیم‌ها می‌توان به عفونت‌های واژن، دستگاه ادراری، گوش میانی و پلاک دندان اشاره کرد (۲). باکتری‌های مختلفی توانایی ایجاد بیوفیلیم را دارند که از جمله آنها می‌توان به سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلای، لیستریا مونوسیتوزنز، استافیلوکوک‌ها و باسیلوس‌ها اشاره کرد (۱، ۲).

بیوفیلیم‌ها 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

بیوفیلیم‌ها جمعیت میکروبی متراکمی هستند که به سطوح جامد و یا سطوح بافتی احاطه شده توسط پوشش پلی‌ساکاریدی متصل می‌شوند. قدمت بیوفیلیم به ۲/۸ میلیارد سال قبل، یعنی درست زمانی که حیات بر روی کره زمین آغاز شد برمی‌گردد (۱). بیوفیلیم‌ها قادر هستند بر روی سطوح زنده و غیرزنده تشکیل شوند. از جمله تأثیرات مخرب بیوفیلیم‌ها

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

باکتری‌های استاندارد سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلازی 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 بیوفیلیم با استفاده از روش میکروپلیت

ابتدا از روی محیط جامد، یک کلنی ۲۴-۱۸ ساعته برداشتم 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 طول موج 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 سوپانسیون میکروبی اضافه و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد.

سنجش تولید بیوفیلیم

بعد از گرمخانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت به منظور سنجش مقدار تولید بیوفیلیم 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 یوله ۰/۱ درصد برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رنگ آمیزی 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 بیوفیلیم در نظر گرفته شد.

آزمون تعیین MIC

جهت انجام تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC) از روش ماکرودایلوشن برات و تهیه کشت ۲۴ ساعته باکتری بر روی محیط مولر هینتون آگار رقت باکتری به اندازه نیم مک فارلند $10^8 \times 1/5$ به دست آمد. این رقت از باکتری برحسب استاندارد انستیتو آزمایشگاه و بالین (CLSI)، ۳۰۰ برابر رقیق شد تا به رقت $10^6 \times 5$ رسید. ۰/۱ ml از این سوپانسیون برداشته شد و در چاهک به حجم ۰/۲ ml برده شد و به غلظت $10^5 \times 2/5$ رسید که تقریباً بر اساس استاندارد CLSI بود. حداقل غلظت ممانعت از رشد برای باکتری اشرشیاکلازی برحسب آنتی بیوتیک ایمپی‌پنم $MIC \geq 4$ ، $MIC = 2$ و $MIC \geq 1$ بود که به ترتیب به‌عنوان میکروارگانسیم‌های مقاوم و نیمه حساس و

به سطوح مختلف می‌شوند و اصولاً باکتری‌ها با تشکیل بیوفیلیم 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 بیوفیلیم‌ها در شرایط نامساعد می‌شود. در ضمن روابط هم‌یاری بین باکتری‌ها و بیوفیلیم در مقاومت آن‌ها در مقابل شرایط نامساعد مؤثر است (۴). گستردگی بیوفیلیم‌ها بر روی هر نوع سطحی که میکروارگانسیم‌ها وجود دارند، امکان‌پذیر است و در همه محیط‌های آبی نیز دیده می‌شوند که در شرایط گوناگون دارای نقش اتصال هستند (۴-۲).

اشرشیاکلازی شایع‌ترین و مهم‌ترین جنس در خانواده انتروباکتریاسه است که در پزشکی اهمیت دارد. باکتری بی‌هوازی 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 به‌طور معمول در محیط‌های مرطوب بیمارستانی یافت می‌شود. بیوفیلیم‌های ایجاد شده توسط اشرشیاکلازی و سودوموناس آئروژینوزا مشکلات شدیدی در بیمارانی مانند فیبروز کیستیک ایجاد می‌کنند (۵، ۶). برم‌هگزین به صورت دارو عموماً برای خلط‌آوری 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). ایمپی‌پنم در گروه کارباپنم‌ها قرار می‌گیرد و می‌تواند بر روی بسیاری از باسیل‌های گرم منفی، باکتری‌های گرم مثبت و بی‌هوازی‌ها مؤثر باشد (۸). جنتامایسین از جمله آنتی‌بیوتیک‌هایی 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 ایمپی‌پنم و جنتامایسین بر روی تشکیل بیوفیلیم است.

مواد و روشها

جمع‌آوری سویه‌های استاندارد باکتریایی

بودند (جدول ۱). در باکتری سودوموناس آئروژینوزا میانگین تولید بیوفیلم در ستون مربوط به سوسپانسیون باکتری $0.4 \mu\text{g/ml}$ ، در ستون مربوط به آمبرکسول $0.28 \mu\text{g/ml}$ ، در ستون مربوط به آمبرکسول و ایمپینم $0.2 \mu\text{g/ml}$ و در ستون مربوط به آمبرکسول و جنتامایسین $0.24 \mu\text{g/ml}$ بود. بنابراین با توجه به این نتایج، ترکیب ایمپینم با آمبرکسول بیشتر از آمبرکسول به تنهایی و ترکیب آمبرکسول با جنتامایسین بر روی پایین آوردن بیوفیلم تاثیر داشتند. بالاترین غلظت آمبرکسول $3/75$ میکروگرم در هر میلی لیتر و بالاترین غلظت ایمپینم 32 و جنتامایسین 128 میکروگرم در هر میلی لیتر بود و هر کدام تا 12 رقت پایین تر 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 در زمینه بیوفیلم و مقاومت‌های دارویی و استفاده از انواع عصاره‌ها انجام شده است، مشاهده شده است که استفاده از آنتی بیوتیک‌های مختلف به تنهایی 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).

حساس تلقی شد و بر حسب آنتی بیوتیک جنتامایسین مقدار $MIC \geq 16$ ، $MIC = 8$ و $MIC \geq 4$ بود که به ترتیب به عنوان میکروارگانسیم‌های مقاوم و نیمه حساس و حساس تلقی شد. برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا بر حسب آنتی بیوتیک ایمپینم مقدار $MIC \geq 8$ ، $MIC = 4$ و $MIC \geq 2$ به ترتیب به عنوان میکروارگانسیم‌های مقاوم، نیمه حساس و حساس تلقی شد و بر حسب آنتی بیوتیک جنتامایسین $MIC \geq 16$ ، $MIC = 8$ و $MIC \geq 4$ به ترتیب به عنوان میکروارگانسیم‌های 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 $0.3 \mu\text{g/ml}$ ، در ردیف مربوط به آمبرکسول $0.17 \mu\text{g/ml}$ ، در ردیف مربوط به آمبرکسول و ایمپینم $0.17 \mu\text{g/ml}$ و در ردیف آمبرکسول و جنتامایسین $0.22 \mu\text{g/ml}$ بود. بنابراین با توجه به این نتایج، ترکیب ایمپینم با آمبرکسول و آمبرکسول به تنهایی تقریباً 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 $3/75$ میکروگرم در هر میلی لیتر و بالاترین غلظت ایمپینم 32 و جنتامایسین 128 میکروگرم در هر میلی لیتر بود و هر کدام تا 12 رقت پایین تر هم موثر

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

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
سوسپانسیون باکتری	0.331	0.343	0.311	0.356	0.241	0.38	0.355	0.332	0.283	0.354	0.373	0.339
آمبرکسول	0.214	0.133	0.135	0.13	0.133	0.135	0.155	0.126	0.187	0.246	0.253	0.273
ایمپینم+آمبرکسول	0.093	0.085	0.06	0.136	0.14	0.137	0.211	0.256	0.247	0.24	0.258	0.273
جنتامایسین+آمبرکسول	0.202	0.165	0.235	0.253	0.137	0.143	0.187	0.221	0.17	0.241	0.303	0.398

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

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
سوسپانسیون باکتری	0.346	0.339	0.206	0.267	0.453	0.375	0.4	0.39	0.337	0.52	0.531	0.712
آمبرکسول	0.249	0.224	0.209	0.138	0.2	0.494	0.335	0.317	0.2	0.284	0.347	0.41
ایمپینم+آمبرکسول	0.112	0.094	0.079	0.127	0.138	0.242	0.209	0.247	0.206	0.353	0.311	0.384
جنتامایسین+آمبرکسول	0.204	0.134	0.229	0.263	0.194	0.218	0.185	0.239	0.230	0.325	0.376	0.376

در مطالعه لوو و همکارانش، 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 اشرشیاکلاهی 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 بیوفیل‌های 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 آزلو و افزایش توان داروی ضد قارچی ترکیب شده با برم‌هگزین توان مقابله با بیوفیلم قارچی مانند کاندیدا پاراسیلویسیس 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 اشرشیاکلاهی 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 در حال 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 اشرشیاکلاهی 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 برم‌هگزین در رقت‌های ذکر شده باعث کاهش در تجمع بیوفیلم باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلاهی شد و همسو بودن با نتایج آزمایش ما را در پی داشت (۱۸). هم چنین بر طبق مطالعه‌ای که کاتالیدی و همکارانش بر روی تأثیر متابولیت‌های برم‌هگزین در کودکان مبتلا به عارضه تنفسی انجام دادند، تأثیر مثبت این دارو در درمان خلط ناشی از عفونت تنفسی مشاهده شد (۱۹).

در نتیجه، تحقیقات باید بیشتر به مبحث بیوفیلم‌ها که عمدتاً 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.