

## Studying the Relationship between the Ability of Biofilm Formation and Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii* Clinical and Environmental Isolates in Tehran, 2015

Faegheh Teymori<sup>1</sup>, Nour Amirmozafari Sabet<sup>2\*</sup>

1.MSc in Microbiology, Department of Basic Sciences, Faculty of Basic Sciences, Sciences and Research Branch of Tehran, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2.Professor, Department of Microbiology, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran

Received: 8 Jan 2017, Accepted: 7 May 2017

### Abstract

**Background:** *Acinetobacters* are aerobic gram-negative bacteria which are distributed widespread in soil and water. The bacteria are isolated from cultured skin, mucous membranes, secretions and hospital environment. *Acinetobacter baumannii*, is a strain that more frequently isolated. *Acinetobacter* strains are often resistant against antimicrobial agents.

**Materials and Methods:** The method of this study was based on field, observation and test. On August and October 2015, samples were isolated from the soil and water of the Sadeghieh Square river in Tehran, respectively, and were transferred to the laboratory in the ice pack. 50 *baumannii* samples were isolated by biochemical methods (TSI, SIM, OF and gram test). November 1394, 100 clinical samples were isolated from Imam Khomeini hospital by biochemical method, and in the culture media Mueller Hinton agar plates were transferred to the laboratory. Antibigram test for 150 *baumannii* samples was performed. Biofilms formation of *Acinetobacter baumannii* environmental and clinical samples was investigated by Congo red agar and culture plate methods.

**Results:** In all samples (clinical and soil), most of antibiotic resistance was 92% for imipenem and the resistance of water samples to imipenem was 99.9%. Biofilm formation by Congo red agar in water, soil, and clinical samples was respectively 44%, 40% and 1%. All isolates were negative biofilm culture plate.

**Conclusion:** Considering *Acinetobacter baumannii* resistance to antibiotics and the lack of biofilm formation of in clinical and environmental isolates, it was concluded that there wasn't any relationship between antibiotic resistance and biofilm formation.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, Biofilm, Drug Resistance, Imipenem

\*Corresponding Author:

Address: Department of Microbiology, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran

Email: Mozafari.n@iums.ac.ir

## بررسی ارتباط بین توانایی تشکیل بیوفیلم و مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های کلینیکی و محیطی *اسینتوباکتر بومانی* در شهر تهران ۱۳۹۴

فائقه تیموری<sup>۱</sup>، نور امیر مظفری ثابت<sup>۲\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
۲. استاد، گروه میکروبی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۱۷

### چکیده

**زمینه و هدف:** *اسینتوباکترها*، باکتری‌های گرم منفی هوازی هستند که به طور فراگیر در خاک و آب توزیع شده‌اند. این باکتری‌ها، از کشت پوست، غشاهای مخاطی، ترشحات و محیط بیمارستان جداسازی می‌گردند. *اسینتوباکتر بومانی*، گونه‌ای است که با شیوع بیش‌تری جداسازی می‌شود. سوش‌های *اسینتوباکتر* اغلب در برابر عوامل ضد میکروبی مقاوم هستند.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه به صورت میدانی، مشاهده و آزمون صورت گرفت. نمونه‌ها در مرداد ماه ۱۳۹۴ از محیط خاک گلدان و در مهر ماه ۱۳۹۴ از آب رودخانه صادقیه تهران جدا شدند و داخل ظرف حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل گردیدند. به وسیله روش‌های بیوشیمیایی (OFS, SIM, TSI) و آزمایش گرم)، ۵۰ نمونه *اسینتوباکتر بومانی* جداسازی شد. در آبان ماه ۱۳۹۴، ۱۰۰ نمونه بالینی به روش بیوشیمیایی از بیمارستان امام خمینی جداسازی و داخل پلیت محیط کشت مولر هینتون آگار به آزمایشگاه منتقل شد. آزمون آنتی‌بیوگرام برای ۱۵۰ نمونه *اسینتوباکتر بومانی* انجام شد. تشکیل بیوفیلم نمونه‌های محیطی و بالینی *اسینتوباکتر بومانی* به روش کشت در پلیت و کونگورد آگار بررسی گردید. **یافته‌ها:** در نمونه‌های بالینی و خاک، بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به ای‌می پنم و برابر با ۹۲ درصد بود و نمونه‌های آب ۹۹/۹ درصد به ای‌می پنم مقاوم بودند. تشکیل بیوفیلم با روش کونگورد آگار در نمونه‌های آب ۴۴ درصد، خاک ۴۰ درصد و بالینی ۱ درصد بود. روش کشت در پلیت بیوفیلم همه جدایه‌ها منفی بود.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به مقاومت *اسینتوباکتر بومانی* به آنتی‌بیوتیک‌ها و عدم تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های محیطی و بالینی، این نتیجه حاصل شد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم در *اسینتوباکتر بومانی* به هم ارتباط ندارند.

**واژگان کلیدی:** *اسینتوباکتر بومانی*، بیوفیلم، مقاومت دارویی، ای‌می پنم

\*نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، گروه میکروبی‌شناسی

Email: Mozafari.n@iums.ac.ir

## مقدمه

اسینتوباکتر بومانی یک کوکو باسیل گرم منفی غیر تخمیری هوازی متعلق به خانواده موراکسله است (۱). بیشتر مناطق رایج عفونت توسط اسینتوباکتر بومانی در ریه و عفونت ادراری و عفونت زخم و سپتی سمی می‌باشد (۲). سوش‌های اسینتوباکتر، اغلب در برابر عوامل ضد میکروبی، مقاوم هستند لذا درمان کردن عفونت می‌تواند مشکل باشد (۳). مقاومت دارویی در اسینتوباکتر امری عادی است زیرا به عملکرد بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است و توانایی بسیار استثنایی در کسب DNA خارجی شامل ژن‌های مقاومت دارویی دارد (۴). از میان اسینتوباکترها، اسینتوباکتر بامانی، بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را نشان داده است که این مقاومت بر ۲ نوع است: Multi Drug Resistance Acinetobacter و Pan - Drug Resistance Acinetobacter. مقاومت دارویی مشکلاتی را در درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری به وجود آورده است. کارباینها داروی انتخابی در درمان عفونت‌های شدید هستند. علت اصلی ایجاد این مقاومت در باکتری وجود کارباینماز و مکانیسم‌های دیگر مثل تغییر پروتئین‌های غشای خارجی و غیره است (۵). مقاومت به کارباینمازها در میان اسینتوباکتر بومانی می‌تواند به واسطه دو گروه بتالاکتاماز مثل اگراسیلینازهای هیدرولیز کننده کارباینما هم‌چنین کلاس B متالو بتالاکتامازها باشد (۶). به اجتماع سلول‌های میکروبی که محکم به سطحی اتصال پیدا می‌کنند با یک ماتریکس پلی ساکاریدی که دارای منشأ میکروبی است بیوفیلم می‌گویند. 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 سینرژسم و هم‌یاری بین باکتری‌های بیوفیلم در مقاومت آن‌ها در مقابل شرایط نامساعد مؤثر است (۷، ۸).

اسینتوباکتر بومانی یک پاتوژن مهم بیمارستانی است که کنترل عفونت‌های حاصل از آن، به علت مقاومت‌های دارویی چندگانه مشکل است (۹). مصرف

آنتی‌بیوتیک‌ها به طور وسیع از عوامل عمده‌ی کسب مقاومت است. در سال ۲۰۱۱ گزارش شده که مجموعه‌ای از ژن‌های بسیار متنوع کد کننده مقاومت به داروهای مختلف از جمله بتالاکتام‌ها، تتراسایکلین‌ها و گلیکوپپتیدها در اسینتوباکتر شناسایی شده است (۱۰).

۱- آیا مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های بیمارستانی، بیشتر از مقاومت‌های مشاهده‌شده در ایزوله‌های محیطی هست؟

۲- آیا ارتباط بین میزان مقاومت‌های چندگانه و توانایی تشکیل بیوفیلم، وجود دارد؟  
بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به پزشکان اطلاعات مفیدی جهت انتخاب درمان تجربی مناسب می‌دهد. شناسایی سویه‌های مقاوم در یک منطقه جغرافیایی به منظور جلوگیری از گسترش آن‌ها بسیار حائز اهمیت است (۱۱).

## مواد و روش‌ها

نوع مطالعه به صورت مشاهده، آزمون و میدانی، در مدت‌زمان مرداد ماه تا دی ماه ۱۳۹۴، در آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، انجام شد.

برای انجام تحقیق در ابتدا، محیط مایع غنی‌شده جهت رشد اسینتوباکتر بومانی با استفاده از روش به‌کاررفته توسط بوومن ساخته شد (۱۲).

## جمع‌آوری اسینتوباکتر، از خاک

در مرداد ماه ۱۳۹۴، از ۵-۱۰ سانتی‌متری خاک گلدان خانگی، سه بار نمونه برداری شد و در ظروف استریل ادرار (UC) داخل ظرف حاوی یخ، به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی منتقل گردید.

۱۰ گرم از خاک وزن شد و با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر روی شیکر (مدل GFL ۳۰۱۵)، مخلوط شد؛ سپس ذرات بزرگ موجود در خاک با صافی (واتمن ۴۱) جدا گردید. مخلوط خاک بعد از عبور از صافی، به مدت ۵ دقیقه با ۹ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. زیر هود و در شرایط استریل، مایع رویی به محیط کشت مایع غنی‌شده منتقل گردید و به

مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه (مدل theben) شد؛ سپس لام گرفته شد.

### جمع‌آوری نمونه‌ها از آب

جمع‌آوری آب از رودخانه فلکه دوم صادقیه تهران، در ظروف استریل کشت ادرار (uc) انجام شد؛ به صورتی که ظرف با درب بسته کاملاً داخل آب فروبرده شد و در زیر آب درب باز شد، سپس بعد از پر شدن ظرف از آب، درب آن داخل آب بسته شد و در ظرف حاوی یخ قرار داده شد و به آزمایشگاه انتقال یافت. به میزان ۵ میلی‌لیتر از آب اندازه‌گیری شد و در شرایط کاملاً استریل به محیط کشت غنی‌شده انتقال داده شد و بعد از اضافه کردن منبع کربن و منبع نیتروژن به آن، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمابه‌گذاری گردید. سپس از نمونه‌ها لام گرفته شد و کوکسی زیر میکروسکوپ نوری، مشاهده شد. از سوسپانسیون میکروبی نمونه‌های آب و خاک با آنس، زیر هود و در شرایط استریل به صورت خطی روی محیط کشت مک کانکی آگار کشت جهت ایزوله کردن *اسیتوباکتر بومانی* داده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمابه‌گذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت از هر یک کلنی، مجدداً کشت خطی داده شد و درون انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفته شد، این کار با چند بار تکرار متوالی انجام گرفت تا باکتری به صورت خالص جمع‌آوری شد.

### جمع‌آوری نمونه بالینی

تعداد ۱۰۰ ایزوله *اسیتوباکتر بومانی* از بیمارستان امام خمینی تهران جمع‌آوری شد، در محدوده زمانی مهر ۱۳۹۴ تا آبان ۱۳۹۴ این باکتری‌ها از نمونه‌های بالینی مختلف نظیر؛ زخم، خلط، ترشحات لوله تراشه، ادرار، خون، مایع مغزی نخاعی و سایر ترشحات بدن جدا شد. باکتری‌ها در محیط‌های مولر هیتون آگار به آزمایشگاه باکتری‌شناسی منتقل شدند.

### ایزوله کردن *اسیتوباکتر بومانی*:

جهت شناسایی و تأیید ایزوله‌های *اسیتوباکتر بومانی* جمع‌آوری‌شده محیطی و بالینی، از آزمایش‌های مختلف بیوشیمیایی استفاده گردید؛ بررسی

اکسیداز، OF و حرکت در محیط SIM، TSI رشد در دمای ۴۴ درجه سلسیوس انجام گردید.

### نگهداری ایزوله‌های *اسیتوباکتر بومانی*

*اسیتوباکترها* پس از شناسایی، در محیط تریپتیکازسوی براث حاوی ۱۵ درصد گلیسرول کشت داده‌شده و در دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (۱۳).

### آنتی بیوگرام

پس از تلقیح سوسپانسیون باکتری به محیط‌های کشت جامد، دیسک حاوی آنتی بیوتیک پس از گذشت ۵ تا ۱۵ دقیقه از تلقیح، به کمک یک پنس استریل در سطح آن قرار داده می‌شود. دیسک‌ها بافاصله ۲۲ میلی‌لیتر از یکدیگر و ۱۶ میلی‌لیتر از جداره پلیت در روی محیط قرار داده شدند. لازم به ذکر است که دیسک‌ها، یک ساعت قبل از استفاده بایستی در دمای اتاق قرار گیرند. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه از قرار دادن دیسک‌ها، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. پس از گذشتن زمان انکوباسیون در ۳۷ درجه سلسیوس، قطر هاله عدم رشد با خط‌کش اندازه‌گیری و تفسیر آن با توجه به جدول CLSI برای *اسیتوباکتر*، انجام شد.

### بررسی تشکیل بیوفیلم

روش *Microtitre plate method*: روش کمی در تشخیص میزان تشکیل بیوفیلم (۱۴).  
روش کنگورد آگار: روش کیفی در تشخیص بیوفیلم تشکیل‌شده توسط میکرو ارگانیزم است (۱۵).

### کشت *اسیتوباکتر بومانی* در کنگورد آگار جهت

#### بررسی بیوفیلم

تهیه استوک ۰/۸ درصد کنگورد: ۰/۸ گرم پودر کنگورد، در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و در شیشه‌های ۵۰ میلی‌لیتری تقسیم گردید و با اتوکلاو کردن استریل گردید.

تهیه استوک ۳۶ درصد گلوکز: ۳۶ گرم از پودر گلوکز در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و با اتوکلاو کردن استریل گردید.

برای تهیه محلول کنگورد آگار: به منظور تهیه یک لیتر از محیط کنگورد آگار، ۳۷ گرم از پودر BHI همراه با ۱۰

ورتکس کردن به میزان ۲۰۰ میکرو لیتر به چاهک‌های پلی استایرن استریل ۹۶ خانه ایی کف صاف انتقال داده شد. برای کنترل منفی از محیط‌های تازه و برای کنترل مثبت از باکتری *E. coli* بیوفیلم مثبت استفاده شد. بعد از اتمام کار چاهک‌ها، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد و بعد از مدت‌زمان تعیین‌شده بیوفیلم موردبررسی قرار گرفت.

#### یافته‌ها

بیش‌ترین درصد فراوانی اسینتو باکتر بومانی نمونه‌های بالینی، مربوط به نمونه تراشه و خلط به ترتیب با ۳۳ و ۳۰ نمونه و کم‌ترین فراوانی مربوط به نمونه استخوان و CSF به ترتیب ۱ و ۲ نمونه بود. تعداد ۲۵ نمونه اسینتو باکتری بومانی از خاک گلدان‌های بنجامین و شمعدانی جمع‌آوری شد. از تعداد ۳۰ نمونه آب رودخانه فلکه دوم صادقیه، ۲۵ نمونه اسینتو باکتر بومانی جمع‌آوری شد. در محیط کشت مکانکی آگار: نمونه‌ها به صورت صاف، صورتی، موکویدی مشاهده شد. در رنگ‌آمیزی اسینتو باکتر، به صورت کوکو باسیل گرم متغیر دیده شد. جهت شناسایی و تأیید ایزوله‌های اسینتو باکتر بومانی جمع‌آوری شده محیطی و بالینی، از آزمایش‌های مختلف بیوشیمیایی استفاده گردید؛ بررسی اکسیداز (منفی)، OF (زرد به روی سبز در لوله بدون پارافین و سبز به روی سبز، در لوله پارافین دار) و بی حرکت بودن در محیط SIM، عدم تخمیر قندها در محیط TSI (قرمز روی قرمز)، رشد در دمای ۴۴°C انجام شد.

گرم آگار در ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید و با استفاده از گرماساز شیکردار حل، سپس برای استریل، اتوکلاو شد.

پس از خروج از اتوکلاو وقتی دما به ۴۰ تا ۵۰ درجه رسید، محلول استریل شده گلوکز و هم‌چنین محلول کنگورد به محیط افزوده شد و کاملاً مخلوط گردید تا محیط یکنواخت شود. سپس بر روی پلیت‌های ۳ تایی تقسیم گردید و پس از بسته شدن محیط درون پلیت، به‌منظور کنترل کیفی آلودگی به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت، در ۳۷ درجه سلسیوس، گرما گذاری شد و بعد از آلوده بودن خارج گردید. یک کلنی از کشت تازه و خالص باکتری برداشته شد و بر روی محیط کنگورد کشت داده شد و سپس پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه، گرما گذاری شد و بعد از گذشت این مدت، پلیت‌ها خارج گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط گذاشته شد. سپس از لحاظ رنگ کلنی موردبررسی قرار گرفت.

#### تشکیل بیوفیلم از طریق روش میکروتیتر پلیت

ابتدا از نمونه‌های بالینی و محیطی، کشت تازه و خالص داده شد، به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوبه قرار گرفت. به تعداد ۳۰۰ عدد لوله حاوی محیط کشت مولر هینتون براث با ۱ درصد گلوکز ساخته شد. سپس نیمی از محیط‌ها را با استفاده از لوپ استریل کلنی به مقدار زیاد برداشته و به لوله انتقال داده شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند، سپس به مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از لوله‌هایی که باکتری رشد کرده بود به محیط‌های تازه اضافه شد بعد از

جدول ۱. آنتی‌بیوتیک‌های استفاده‌شده در آزمون آنتی بیوگرام

آنتی‌بیوتیک	مقدار استفاده‌شده (mgr)	علامت اختصاری آنتی‌بیوتیک
آمپی‌سیلین	۱۰/۱۰	AM
سیپروفلوکسازین	۵	CIP
جنتامایسین	۱۰	GM
کوتریماکسازول	۲۵	CO
کلیستین	۱۰	CL
سفتازیدیم	۳۰	CAZ
ایمی پنم	۱۰	IMP

جدول ۱ آنتی‌بیوتیک‌ها و میزان به کار رفته در آزمون آنتی‌بیوگرام/اسیتوباکتر بومانی را نشان داد. بر اساس قطر هاله‌های عدم رشد در مورد هر آنتی‌بیوتیک و مقایسه این مقادیر با جدول استاندارد حساسیت یا مقاومت باکتری به آن آنتی‌بیوتیک تعیین گردید.

آزمون آنتی‌بیوگرام که بر اساس آنتی‌بیوتیک‌های جدول ۱ صورت گرفت نشان داد ۹۲ درصد اسیتوباکتر بومانی جدا شده از نمونه‌های بالینی مقاوم به ایمی پنم و ۹۹/۹ درصد نمونه‌ها حساس به کلیستین بودند. در نمونه‌های خاک ۹۲ درصد به ایمی پنم و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. نمونه‌های آب ۹۹/۹ درصد مقاوم به ایمی پنم و ۹۹/۹ درصد حساس به کلیستین بودند.

تشکیل بیوفیلم با روش کنگورد آگار در نمونه‌های بالینی، ۱ درصد پلیت‌ها سیاه رنگ و بیوفیلم مثبت بود، ۹۷ درصد قرمز روشن و بیوفیلم منفی و ۲ درصد قرمز تیره و بیوفیلم نامشخص.

در نمونه‌های خاک ۵۲ درصد بیوفیلم مثبت و ۴۰ درصد بیوفیلم منفی بود. نمونه‌های آب ۵۶ درصد بیوفیلم مثبت و ۴۴ درصد بیوفیلم منفی بود.

روش میکروتیتر پلیت، برای ۱۰۰ نمونه بالینی و ۵۰ نمونه محیطی اسیتوباکتر بومانی جدا شده و ۲ نمونه باکتری *E. coli* به‌عنوان شاهد کنترل مثبت به منظور بررسی ارتباط بین توانایی تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بررسی شد. در نمونه‌های بالینی، خاک و آب، بیوفیلم تشکیل ندادند.

### بحث و نتیجه‌گیری

در طی دهه گذشته حضور اسیتوباکتر بومانی را به‌عنوان موفق‌ترین بیماری‌زای بیمارستانی در سراسر دنیا شاهد بوده‌ایم. بخشی از این رخداد، مربوط به توانایی بقا این میکروارگانیسم، در محیط‌های بیمارستانی و کسب مکانیسم مقاومت و ایجاد عفونت‌های حاد به‌ویژه، در بیماران بدحال است. اگرچه اطلاعات زیادی در مورد مکانیسم‌های مسئول مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این

میکروارگانیسم موجود است، ولی هم‌چنان قادر به متوقف کردن آن نیستیم. امروزه شاهد سویه‌های با مقاومت جهانی و حتی مقاوم به کولیستین هستیم که درمان را با محدودیت جدی مواجه کرده است (۱۶).

در این تحقیق از روش فنوتیپی برای شناسایی اسیتوباکتر بومانی استفاده شد. تعداد ۱۰۰ ایزوله از نمونه‌های بالینی، بیمارستان امام خمینی جمع‌آوری شد. تحقیقاتی که در این زمینه در ایران انجام شده عبارت‌اند از: ۱۰۲ اسیتوباکتر بومانی جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان قائم مشهد در سال ۱۳۹۱ (۱۷). سال ۱۳۹۲ در یک دوره سه ماهه، با استفاده از روش سواب، ۴۰ نمونه از قسمت‌های مختلف بخش‌های ICU و جراحی بیمارستان الزهرا شهر اصفهان گرفته شد، از مجموع ۲۰۲ ایزوله به‌دست آمده، ۱۰۹ ایزوله (۵۳/۹۶ درصد) کوکسی و باسیل گرم مثبت و ۹۳ ایزوله (۴۶/۰۳ درصد) جداسازی گردید که ۲۱ ایزوله (۱۰/۳۹ درصد) مربوط به جنس اسیتوباکتر بوده است (۱۸). در این تحقیق آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سلین، سیپروفلوکساسین، جنتامیسین، کوتریماکسازول، کلیستین، سفنازیدیم و ایمی پنم، برای بررسی میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی اسیتوباکتر بومانی، در نمونه‌های بالینی و محیطی انجام شد. بیش‌ترین مقاومت در ۱۰۰ نمونه‌های بالینی اسیتوباکتر بومانی به ایمی پنم (۹۲ درصد) و بیش‌ترین حساسیت به کلیستین (۱۰۰ درصد) بود. بیش‌ترین مقاومت در ۲۵ نمونه‌های خاک به ایمی پنم و سیپروفلوکساسین (۹۲ درصد) و بیش‌ترین حساسیت به جنتامیسین (۱۲ درصد) بود. بیش‌ترین مقاومت در ۲۵ نمونه‌های آب به ایمی پنم (۹۹/۹ درصد) و بیش‌ترین حساسیت به کلیستین (۹۹/۹ درصد) بود. بررسی که در سال ۲۰۰۹ روی اسیتوباکتر جدا شده از تصفیه‌خانه فاضلاب، آن هاربر میشیگان آمریکا، صورت گرفت، از بین آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شد جهت آنتی‌بیوگرام، ۹۷ درصد مقاوم به تری متوپریم و همه نمونه‌ها به کلیستین حساس بوده‌اند. که مشابه تحقیق صورت گرفته بوده است (۱۹). اگرچه شیوع بالایی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی در نمونه‌های آب مشاهده شد، ولی نسبت به نمونه‌های بالینی

بیش تر به آنتی‌بیوتیک حساس هستند (۲۰). مقاومت آنتی‌بیوتیکی که از اسیتوباکترهای جدا شده از آب، تشخیص داده شد؛ نشان‌دهنده این است که اسیتوباکتر ذاتاً مقاوم نیست و احتمالاً تحت فشار یا دریافت ژن مقاومت کسب کرده است (۲۱). تحقیقی که سال ۲۰۰۲ انجام شد، از ۵۶ نمونه جمع‌آوری شده از نمونه‌های محیطی، ۲۲ مورد اسیتوباکتر تشخیص داده شد که ۱۸/۳ درصد از نمونه‌ها مقاوم به ایمی پنم بود ولی در این تحقیق بیش از ۹۰ درصد نمونه‌ها به ایمی پنم مقاوم بود، که احتمالاً مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک سبب مقاوم‌تر شدن اسیتوباکتر با گذشت زمان شده است (۲۲). بررسی آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها نمایان‌گر این موضوع می‌باشد که سویه‌های محیطی دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی بوده که این امر شانس بقای باکتری را در محیط‌هایی مانند بخش ICU که بیماران آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیفی مانند کرباپنم‌ها را مصرف می‌نمایند را افزایش می‌دهد (۲۳). با توجه به مطالعه حاضر و سایر مطالعات ارائه شده ۳ داروی کولیسیتین، سیپروفلوکساسین و آمپی‌سیلین داروهایی مؤثری علیه عفونت اسیتوباکتر بومانی می‌باشد. چسبندگی و توانایی تشکیل بیوفیلم در اسیتوباکتر بومانی، نقش محوری در میزان پاتوژن بودن و ایجاد عفونت در دستگاه‌های مربوط به پزشکی بازی می‌کند (۲۴). در سال ۹۴ بررسی تأثیر اسانس الکی گیاه مرزه خوزستانی بر روی بیان ژن مرتبط با بیوفیلم اسیتوباکتر بومانی (bap) به روش Real time PCR صورت گرفت و با توجه به تأثیر مهار اسانس مرزه خوزستانی علیه ژن بیوفیلم اسیتوباکتر بومانی احتمالاً بتوان از این اسانس به‌عنوان مکمل درمانی علیه این باکتری و مهار ژن ویرولانس آن استفاده نمود (۲۵). به‌طور کلی، دو عامل اغلب با باکتری تولیدکننده بیوفیلم همراه است؛ یکی افزایش سنتز EPS و دوم توسعه مقاومت به آنتی‌بیوتیک (۲۶). می‌توان احتمال داد که افزایش تولید EPS در اسیتوباکتر بومانی، برای ایجاد یک محیط محافظ است که منجر به مشکل شدن نفوذ آنتی‌بیوتیک و توسعه مقاومت می‌شود. در تحقیق حاضر تشکیل بیوفیلم توسط اسیتوباکتر بومانی، با دو

روش Microtiter plate و کنگورد آگار بررسی شد. که در نمونه‌های اسیتوباکتر جدا شده از آب، ۵۶ درصد تشکیل بیوفیلم در روش کنگورد آگار مشاهده شد. در نمونه‌های جدا شده از خاک، ۵۲ درصد تشکیل بیوفیلم در روش کنگورد آگار مشاهده شد و نمونه‌های بالینی فقط ۱ درصد تشکیل بیوفیلم در محیط کنگورد آگار داشتند؛ ولی در روش کشت در پلیت که روشی کمی در تشخیص بیوفیلم است در نمونه‌های بالینی ۲۳ درصد، خاک ۵۳ درصد و آب ۳۱ درصد، بیوفیلم تشکیل دادند. تحقیقی که سال ۲۰۰۸ انجام شد، نمونه‌هایی که بیوفیلم تشکیل ندادند مقاومت بالایی به نتیلین و افلوکساسین نشان دادند و ۶۲ درصد نمونه‌ها تولید بیوفیلم داشتند که مقاوم به ایمی پنم و سیپروفلوکساسین بودند (۲۴).

#### نتیجه‌گیری

با توجه به این که روش کشت در پلیت، روش دقیق‌تری است، این نتیجه حاصل شد که در اسیتوباکتر بومانی جدا شده از نمونه‌های بالینی و محیطی، بیوفیلم تشکیل نشده است؛ بنابراین مقاومت اسیتوباکتر بومانی در نمونه‌های محیطی و بالینی در ارتباط با تشکیل بیوفیلم هستند.

عفونت اسیتوباکتر بومانی، یک چالش پزشکی جهانی است. پاتوژن‌های فرصت‌طلب و به خصوص در تجمع و تداوم در محیط بیمارستان موفق هستند. قادر به مقاومت در برابر خشکی می‌باشند و در سطوح بی‌جان برای سال زنده می‌مانند (۲۷). در میان شایع‌ترین علل عفونت بیمارستانی قرار دارد؛ به علت مقاومت در برابر عوامل فیزیکی و شیمیایی، که با تشکیل بیوفیلم ایجاد می‌شود (۲۶). کسب توانایی تشکیل بیوفیلم می‌تواند یک استراتژی خوب، به منظور افزایش بقا تحت شرایط استرس، به‌عنوان مثال، در طول حمله میزبان یا پس از درمان آنتی‌بیوتیک می‌باشد (۲۸). درک بیش‌تری از ماهیت بیوفیلم و ارتباطات بین سلولی در بیوفیلم و همچنین نقش آن‌ها در ارتباط با مقاومت آنتی‌بیوتیکی و عفونت جدای‌های اسیتوباکتر، در توسعه

7. Lear G, Lewis GD. Microbial biofilms: current research and applications: Horizon Scientific Press; 2012.

8. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2(2):95-108.

9. Podnos YD, Cinat ME, Wilson SE, Cooke J, Gornick W, Thrupp LD. Eradication of multi-drug resistant *Acinetobacter* from an Intensive Care Unit. *Surgical Infections*. 2001;2(4):297-301.

10. Liu Y, Cao B, Wang H, Chen L, She D, Zhao T, et al. [Adult hospital acquired pneumonia: a multicenter study on microbiology and clinical characteristics of patients from 9 Chinese cities]. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi= Zhonghua jiehe he huxi zazhi= Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases*. 2012;35(10):739-46.

11. Ahmadi K, Mardaneh J, Saadat S. Determination Antimicrobial Resistance Profile Of *Acinetobacter* Strains Isolated From Hospitalized Patients In Different Part Of Taleghani Hospital (Ahvaz, Iran). *ISMJ*. 2014; 17(4.)

12. Baumann P. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *Journal of bacteriology*. 1968;96(1):39-42.

13. Love R. *Enterococcus faecalis*—a mechanism for its role in endodontic failure. *International endodontic journal*. 2001;34(5):399-405.

14. Christensen GD, Simpson W, Younger J, Baddour L, Barrett F, Melton D, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology*. 1985;22(6):996-1006.

15. Freeman D, Falkiner F, Keane C. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of clinical pathology*. 1989;42(8):872-4.

درمان‌های جدید و مؤثرتر برای عفونت‌های اسیتوباکتر کمک خواهد کرد.

### تشکر و قدردانی

با تشکر فراوان از دانشگاه علوم و تحقیقات تهران و کارکنان محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه که امکانات و تجهیزات لازم برای انجام این تحقیق را فراهم نمودند.

### منابع

1. Ahanjan M, Kholdi S, Rafiei A. Antibiotic-resistance Patterns and Frequency of TEM and CTX Type Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter* Clinical Isolates. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences (JMUMS)*. 2014; 24 (116.)

2. Braun G, Vidotto MC. Evaluation of adherence, hemagglutination, and presence of genes codifying for virulence factors of *Acinetobacter baumannii* causing urinary tract infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004;99(8):839-44.

3. Levinson W, Jawetz E. *Medical microbiology and immunology: examination and board review: Appleton & Lange*; 1996.

4. Camp C, Tatum OL. A review of *Acinetobacter baumannii* as a highly successful pathogen in times of war. *Lab Medicine*. 2010;41(11):649-57.

5. Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. 2010.

6. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International journal of antimicrobial agents*. 2006;27(4):351-3.

- carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*. 2002;52(4):259-62.
23. Towner K. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *Journal of Hospital Infection*. 2009;73(4):355-63.
24. Rao RS, Karthika RU, Singh S, Shashikala P, Kanungo R, Jayachandran S, et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian journal of medical microbiology*. 2008;26(4):333.
25. Bahador A, Saghii H, Atae R, Esmaeili D. The Study of Inhibition Effects Satureja khuzestanica Essence against Gene Expression bap *Acinetobacter baumannii* with Real time PCR Technique. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2015;9(1):42-9.
26. Revdiwala S, Rajdev BM, Mulla S. Characterization of bacterial etiologic agents of biofilm formation in medical devices in critical care setup. *Critical care research and practice*. 2012;2012.
27. Zhao Y-L, Zhou Y-H, Chen J-Q, Huang Q-Y, Han Q, Liu B, et al. Quantitative proteomic analysis of sub-MIC erythromycin inhibiting biofilm formation of *S. suis* in vitro. *Journal of proteomics*. 2015;116:1-14.
28. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*. 2002;15(2):167-93.
16. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 2008;21(3):538-82.
17. Safdari H, Sadeghian A, Tahaghogi S. The Antibiotic Resistance Pattern of *Staphylococcus aureus* Isolated From Patients in Quam University Hospital During 2009-2011. *Journal of Medical and Rehabilitation Sciences*. 2012;1(1):43-6.
18. Fazeli H, Rad TM, Esfahani BN, Pourdard A, Akbari M. Risk factors and prevalence of high resistant *Acinetobacter* spp among hospitalized patients. *Journal of Research in Medical Sciences*. 2014;19(5).
19. Zhang Y, Marrs CF, Simon C, Xi C. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. *Science of the Total Environment*. 2009;407(12):3702-6.
20. Falagas M, Mourtzoukou E, Polemis M, Vatopoulos A. Trends in antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from hospitalised patients in Greece and treatment implications. *Clinical microbiology and infection*. 2007;13(8):816-9.
21. Goñi-Urriza M, Capdepuy M, Arpin C, Raymond N, Caumette P, Quentin C. Impact of an Urban Effluent on Antibiotic Resistance of Riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(1):125-32.
22. Aygün G, Demirkiran O, Utku T, Mete B, Ürkmez S, Yılmaz M, et al. Environmental contamination during a