

کاهش حداقل غلظت مهارکننده رشد آنتی بیوتیک‌ها برای سویه‌های *Acinetobacter baumannii* جدا شده از دستگاه تنفس بعد از غیر فعال سازی فتودینامیکی

خلاصه

نسیم کاشف^۱
مهین یحیایی^۲

مقدمه: با توجه به مقاومت دارویی به ویژه مقاومت به کاربائینم‌ها در سویه‌های *Acinetobacter baumannii* و درگیر شدن بیماران سرکوب شده سیستم ایمنی در بخش مراقبت‌های ویژه به دنبال راهکاری جدید برای از بین بردن این باکتری فرصت طلب از غیر فعال سازی فتودینامیکی استفاده شد. غیر فعال سازی فتودینامیکی روشی است که در آن گونه‌های اکسیژن فعال تولیدشده توسط حساس گر نوری در حضور نور مرئی، سلول‌های میکروبی را از بین می‌برند.

روش بررسی: در این بررسی از حساس گرهای نوری متیلن بلو و تولوئیدین بلو با غلظت نهایی $50 \mu\text{M}$ و دوز نوری 25 J/cm^2 (منبع نوری: لیزر دیود با توان 30 mw) برای غیرفعال سازی فتودینامیکی سویه‌های *Acinetobacter baumannii* استفاده شد. سپس حداقل غلظت مهارکننده رشد برای ۴ آنتی بیوتیک آزیترومایسین، ایمپینم، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین قبل و بعد از غیر فعال سازی فتودینامیکی تعیین شد.

یافته‌ها: کاهش لگاریتمی سلول‌های زنده پس از غیرفعال سازی فتودینامیکی با رنگ‌های متیلن بلو و تولوئیدین بلو برای ۵ سویه *A. baumannii* به ترتیب بین $2/4-2/9$ و $2/2-2/9$ بود. همچنین غیرفعال سازی فتودینامیکی سبب کاهش حداقل غلظت مهارکننده رشد آنتی بیوتیک آزیترومایسین، ایمپینم، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین شد.

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد که غیر فعال سازی فتودینامیکی به نوعی مکانیسم‌های مقاومت باکتری را دستخوش تغییر می‌کند یا سبب افزایش نفوذپذیری دیواره سلولی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: مقاومت آنتی بیوتیکی، غیر فعال سازی فتودینامیکی، *Acinetobacter baumannii*

۱. استادیار باکتری‌شناسی پزشکی، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، بخش میکریبولوژی

۲. کارشناس ارشد میکریبولوژی، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، بخش میکریبولوژی

نویسنده مسئول: نسیم کاشف، تلفن: ۶۱۱۱۳۵۵۸
پست الکترونیک: kashfn@khayam.ut.ac.ir

مقدمه

باتوجه به مطالعات گذشته، هدف از این مطالعه بررسی غیرفعال سازی فتودینامیکی با دو رنگ متیلن بلو و تولوئیدن بلو برای ۵ سویه *A. baumannii* جدا شده از عفونت دستگاه تنفس تحتانی و همچنین بررسی حداقل غلظت مهارکننده رشد (Minimal inhibitory concentration: MIC) برای ۴ آنتی بیوتیک آزیترومایسین، ایمپینم، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین قبل و بعد از غیر فعال سازی فتودینامیکی بود.

روش بررسی

شناسایی جنس و گونه باکتری‌ها:

نمونه‌های برونکوسکوپی از افراد گیرنده پیوند ریه و مبتلا به عفونت دستگاه تنفس تحتانی جمع‌آوری شد. سپس از طریق آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی، جنس و گونه باکتری‌ها تشخیص داده شد.

الگوی حساسیت ضد میکروبی سویه‌ها به روش انتشار از دیسک تعیین شد [۱۵]. بعد از مشاهده نتایج آنتی بیوگرام برای اطمینان از مقاومت به کارباپنم‌ها، پرایمر ژن مقاومت به کارباپنم به نام bla OXA-51-like carbapenemase gene انتخاب شد [۱۶]. توالی پرایمرها به ترتیب زیر بود:

Forward	5-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3
Reverse	5-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3

برای هر ۵ سویه جدا شده از نمونه‌ها، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase chain reaction: PCR) انجام گرفت. برای اطمینان از باندهای مشاهده شده محصول PCR تعیین توالی شد.

تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) آنتی بیوتیک‌ها

آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده آزیترومایسین، ایمپینم، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین بودند. پس از تهیه محلول ذخیره از هر آنتی بیوتیک در حلال خود، سری رقت در سرم فیزیولوژی تهیه شد. محلول‌ها برای هر بار استفاده به صورت تازه ساخته شدند.

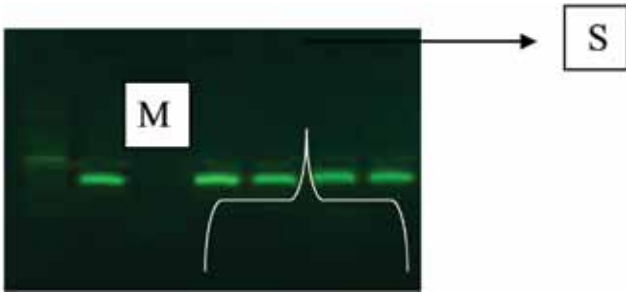
برای هر سویه، سوسپانسیونی با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد. سری رقت به طور جداگانه برای هر آنتی بیوتیک تهیه شد. به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه، ۹۵ μl محیط کشت، ۵ μl سوسپانسیون میکروبی و ۱۰۰ μl از هر غلظت آنتی بیوتیک اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از ۲۴ ساعت، به روش چشمی MIC برای هر آنتی بیوتیک و هر ۵ سویه خوانده شد [۱۷]. چاهک حاوی حداقل غلظت مهار کننده رشد به همراه چاهک قبل و بعد از آن، روی محیط کشت برده شد تا MIC_{۹۰} و MIC_{۵۰} تعیین شود. پس از انجام آزمون

Acinetobacter Baumannii به عنوان یک عامل مهم عفونت‌های بیمارستانی، بخصوص پنومونی ناشی از ونتیلاتور و باکترمی، مننژیت، عفونت‌های پوست و بافت نرم، عفونت‌های دستگاه ادراری و اندوکاردیت مطرح است [۱]. حدود سی سال پیش، عفونت‌های ناشی از این باکتری به شکل کارآمد با آنتی بیوتیک‌های مرسوم قابل درمان بود، اما انتشار جهانی سویه‌های مقاوم به چند دارو، به شکل قابل ملاحظه‌ای تعداد داروهای مؤثر علیه این عامل بیماری‌زا را کاهش داد [۴-۲]. معضل کنترل بالینی عفونت‌های ناشی از این باکتری و عدم وجود مواد ضد میکروبی فعال علیه آن، نیاز مبرم به طراحی استراتژی‌های نوین را برای این گونه عفونت‌ها نشان می‌دهد. چندین مطالعه رویکردهای جدید غیر آنتی بیوتیکی را گزارش کرده‌اند که از آن جمله می‌توان پیشرفت‌هایی در زمینه فازدرمانی [۵]، پپتیدهای ضد میکروبی [۶]، واکسیناسیون پروفیلاکتیک [۷] و فتودینامیک درمانی [۸] علیه *A. baumannii* را نام برد.

در فتودینامیک درمانی ضد میکروبی یا غیرفعال سازی فتودینامیکی یک ماده حساس به نور در میکروب تجمع می‌یابد و در اثر تابش پرتوهای نور با طول موج مشخص و متناسب با حداکثر جذب ماده حساس به نور، اکسیژن منفرد تولید می‌شود که مرگ سلول را به همراه دارد [۹]. عملکرد فتوتوکسیک حساس گره‌های نوری بر روی سلول‌های میکروبی به طور قابل توجهی نسبت به بسیاری از داروهای آنتی بیوتیکی متفاوت است، به عنوان مثال عملکرد وسیع الطیف که در آن حساس گر نوری می‌تواند بر روی باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، انگل‌های تک‌یاخته و ویروس‌ها مؤثر باشد. اثربخشی مستقل از الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی امکان انجام پروتکل‌های غیر فعال سازی فتودینامیکی بدون آسیب رساندن به بافت میزبان، یافت نشدن سویه‌های مقاوم به غیر فعال سازی فتودینامیکی بعد از چند بار درمان، احتمال کم القاء جهش، استفاده از منابع نوری کم هزینه جهت فعال سازی حساس گره‌های نوری، دسترسی آسان و کاربرد راحت آن از دیگر ویژگی‌های غیر فعال سازی فتودینامیکی است [۱۰].

فعالیت دو کلاس متفاوت از حساس گره‌های نوری در برابر *A. baumannii* ارزیابی شده است: تتراپیرول‌ها (همانند پورفیرین‌ها) و نمک‌های فنوتیازینیوم. تتراپیرول‌ها فعالیت خوبی علیه *A. baumannii* مقاوم به چند دارو نشان داده‌اند [۱۱ و ۱۲]. در مطالعه‌ای دیگر استفاده از کیتوزان منجر به افزایش اثر سمی هماتوپورفیرین و تولوئیدن بلو بر سلول‌های پلانکتون *A. baumannii* شد [۱۳]. در مطالعه Ragas و همکاران اثر ۴ رنگ متفاوت از گروه فنوتیازینیوم (متیلن بلو، تولوئیدن بلو، متیلن بلو جدید و دی‌متیل متیلن بلو) بر غیرفعال سازی فتودینامیکی *A. baumannii* مقاوم به دارو بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که هر ۴ رنگ بر این باکتری اثر فتوتوکسیک داشتند. متیلن بلوی جدید مؤثرترین رنگ گزارش شد [۱۴].

مقاوم به دارو است (شکل ۱).

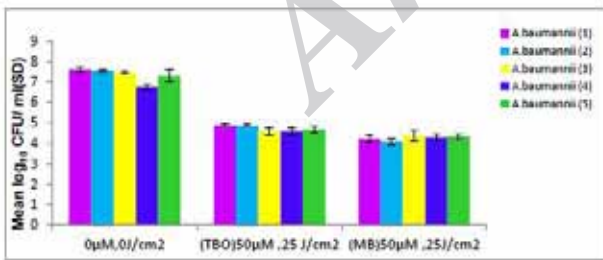


شکل ۱: S: محصول PCR (حضور باند ۳۵۳ bp در ژل الکتروفورز، بیان گر *A. baumannii* مقاوم به کارباپنم است)، M: مارکر ۱۰۰bp

غیرفعال‌سازی فتودینامیکی سویه‌های *A. baumannii* با دو رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدین‌بلو

نتایج حاصل از آنکوباسیون سویه‌ها با دو رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدین‌بلو به‌تنهایی نشان‌داد این غلظت قادر به کاهش تعداد باکتری‌های زنده در مقایسه با گروه کنترل نبود ($P > 0.05$). همچنین پرتودهی با دانسیته انرژی 25 J/cm^2 به‌تنهایی قادر به کاهش در تعداد باکتری‌های زنده در مقایسه با گروه کنترل نبود ($P > 0.05$).

کاهش لگاریتمی سلول‌های زنده باکتریایی پس از غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با غلظت نهایی $50 \mu\text{M}$ از رنگ MB و دوز نوری 25 J/cm^2 برای ۵ سویه *A. baumannii* بین $2/4 - 3/5$ (میانگین $3/1 \pm 0/1 \log$) بود. همچنین کاهش لگاریتمی سلول‌های زنده پس از غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با غلظت نهایی $50 \mu\text{M}$ از رنگ TBO و دوز نوری 25 J/cm^2 برای ۵ سویه *A. baumannii* بین $2/2 - 2/9$ (میانگین $2/6 \pm 0/1 \log$) بود. در تمامی موارد این کاهش در مقایسه با گروه کنترل معنادار بوده است ($P < 0.05$). در نمودار ۱ اثر غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با دو رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدین‌بلو برای ۵ سویه *A. baumannii* نشان داده شده است.



نمودار ۱: اثر غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با دو رنگ MB و TBO (غلظت نهایی رنگ $50 \mu\text{M}$ و دوز نوری 25 J/cm^2) بر روی ۵ سویه *A. baumannii*

کاهش حداقل غلظت مهارکننده رشد هر ۴ آنتی بیوتیک برای سویه‌ها بعد از غیرفعال‌سازی فتودینامیکی

همان‌طور که در جدول‌های ۱ تا ۴ مشاهده می‌شود، غیرفعال‌سازی

های غیرفعال‌سازی فتودینامیکی، MIC برای هر آنتی‌بیوتیک و هر ۵ سویه مجدداً تعیین شد تا اثر غیرفعال‌سازی فتودینامیکی بر تغییر الگوی حساسیت ضد میکروبی سویه‌ها بررسی شود.

آزمون‌های غیرفعال‌سازی فتودینامیکی

رنگ‌های متیلن‌بلو و تولوئیدین‌بلو از شرکت سیگما خریداری شدند. منبع نوری مورد استفاده یک لیزر دیود (Azor K30, continuous mode, Russia) با توان خروجی 30 mw و طول موج 650 nm بود. از سویه‌های مورد نظر روی نوترینت آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. از کشت ۲۴ ساعته، سوسپانسیونی مطابق با کدورت 0.5 مک فارلند ($1/5 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$) تهیه شد. از هر سوسپانسیون، 100 میکرولیتر به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه تلقیح شد. سپس 100 میکرولیتر از رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدین‌بلو با غلظت نهایی $50 \mu\text{M}$ به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی آنکوبه شد. سپس چاهک‌های مورد نظر به مدت ۵ دقیقه تحت تابش دستگاه لیزر (25 J/cm^2) قرار گرفتند. پس از پایان زمان تابش، چند مرتبه پیتاژ انجام شد و بدون خارج کردن و شستشوی رنگ، سری رقت (با سرم فیزیولوژی) تهیه و به میزان 100 میکرولیتر به پلیت نوترینت آگار منتقل شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. کنتی‌های رشد کرده بر سطح محیط شمارش شدند. تمام مراحل سه مرتبه برای هر سویه و برای هر دو رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدین‌بلو عیناً تکرار شد. گروه‌های کنترل به سه دسته تقسیم شدند: گروهی که هیچ‌گونه تیماری روی آن انجام نشد (بدون رنگ، بدون تابش)، گروهی که تنها در معرض تابش منبع نوری قرار گرفت و گروهی که تنها با رنگ مجاور شد.

آزمون‌های آماری

برای آنالیز داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. مقادیر به صورت انحراف معیار \pm میانگین \log_{10} بیان شدند. مقایسه بین میانگین گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون One-Way ANOVA بررسی گردید. مقادیر $P < 0.05$ از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی شدند.

یافته‌ها

شناسایی سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه تنفس تحتانی

همه نمونه‌ها پس از کشت هوازی شامل یک میکروارگانیزم بودند که با انجام تست‌های بیوشیمیایی، *A. baumannii* شناسایی شد. جهت اطمینان از شناسایی *A. baumannii* مقاوم به کارباپنم‌ها از روش PCR استفاده شد که ناحیه اختصاصی ژن bla OXA-51-like کارباپنماز را شناسایی می‌کرد. حضور باند 353 bp نشان‌دهنده وجود این سویه

بحث

مطالعه حاضر جهت ارزیابی اثر غیرفعال سازی فتودینامیکی با استفاده از حساسگرهای نوری تولوئیدن بلو و متیلن بلو بر روی ۵ سویه A.baumannii جدا شده از دستگاه تنفس تحتانی انجام شد. سوسپانسیون باکتری‌ها پس از تیمار با حساسگر نوری تولوئیدن بلو و متیلن بلو در غلظت نهایی ۵۰ μM با مدت زمان انکوباسیون ۵ دقیقه در معرض پرتودهی با لیزری با طول موج متناسب با حداکثر جذب حساسگر نوری (دوز نوری ۲۵ J/cm^۲) قرار گرفت. به‌طور میانگین برای ۵ سویه A. baumannii با حساسگر نوری متیلن بلو ۳/۱ log و با حساسگر نوری تولوئیدن بلو ۲/۶ log کاهش در تعداد باکتری‌ها مشاهده شد. مطالعه Ragas و همکاران (۲۰۱۰) نیز نتایجی مشابه با نتایج مطالعه حاضر داشت. در آن مطالعه کاهش تعداد باکتری‌های A. baumannii در حالت پلانکتون بعد از غیر فعال سازی فتودینامیکی با دو رنگ تولوئیدن بلو و متیلن بلو بین ۲-۳ log گزارش شد [۱۴]. همچنین Donnelly و همکاران (۲۰۰۷) آزمون‌های غیر فعال سازی فتودینامیکی را با دو رنگ تولوئیدن بلو و TMP با غلظت ۵mg/ml روی ۵ سویه P. aeruginosa جدا شده از بیماران سیستمیک فیبروز انجام دادند. نتایج حاصل از این مطالعه کاهش ۹۹/۹۹ درصد در سویه‌های مورد آزمون بود، اما از لحاظ لگاریتمی کم‌تر از حد، کشنده محسوب می‌شد [۱۸].

این مطلب روشن است که اثر فتوباکتریسیدال رنگ‌ها از برهمکنش اولیه بین رنگ‌ها و باکتری‌ها و سپس جایگزینی رنگ و قدرت اتصال آن به سطح سلول باکتری تأثیر می‌پذیرد. Tego و Hamblin (۲۰۰۶) نشان دادند که رنگ‌های فنوتیازینیوم، سوبسترای پمپ‌های دفع دارو در باکتری‌های وحشی مقاوم به دارو هستند [۱۹]. از آنجاکه در مطالعه حاضر از سویه‌های وحشی A. baumannii استفاده شده است که حتماً دارای چنین پمپ‌هایی هستند، پمپ کردن رنگ از غشاء خارجی این باکتری‌ها به محیط خارج می‌تواند دلیلی بر نتایج به دست آمده (اثر فتوتوکسیک کمتر از حد کشنده دو رنگ تولوئیدن بلو و متیلن بلو) در مطالعه حاضر باشد.

در مطالعه حاضر میانگین کاهش لگاریتمی در سویه‌های A. baumannii نشان داد که حساسگر نوری متیلن بلو به‌طور کارآمدتری نسبت به تولوئیدن بلو اثر فتوتوکسیسیتی را نشان می‌دهد. برای زنده ماندن در داخل و خارج از بدن انسان از آهن به‌عنوان ماده ضروری استفاده می‌کند و انواع مختلفی از مولکول‌های پذیرنده آهن از جمله سیدروفورها را تولید می‌نماید. تعداد مولکول‌های سیدروفور A. baumannii به نسبت سایر باکتری‌های گرم منفی بیشتر است [۲۰]. از طرفی متیلن بلو ۲/۵ برابر تولوئیدن بلو توانایی اتصال به سیدروفور را دارد. متیلن بلو ترجیحاً به سیستم سیدروفور متصل می‌شود در حالی که تولوئیدن بلو عمدتاً به LPS متصل می‌شود [۲۱]. این مطلب

فتودینامیکی سبب کاهش حداقل غلظت مهارکننده رشد هر ۴ آنتی‌بیوتیک مورد آزمون برای هر ۵ سویه A. baumannii شد. MIC آنتی‌بیوتیک آزیترومایسین، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین برای هر ۵ سویه A. baumannii قبل از غیرفعال سازی فتودینامیکی در محدوده مقاوم بود که این میزان بعد از غیرفعال سازی فتودینامیکی نیز در همین محدوده قرار گرفت، اما ۴ برابر کاهش غلظت مهارکنندگی رشد را نشان داد. برای آنتی‌بیوتیک ایمپینم، MIC قبل از غیرفعال سازی فتودینامیکی در محدوده مقاوم بود که بعد از آن در محدوده نیمه حساس قرار گرفت (۸ برابر کاهش غلظت مهارکنندگی رشد)

Strain	MIC before PDI (μg/ml)	MIC after PDI (μg/ml)
A.baumannii (۱)	۳۲	۸
A.baumannii (۲)	۳۲	۸
A.baumannii (۳)	۳۲	۸
A.baumannii (۴)	۳۲	۸
A.baumannii (۵)	۳۲	۸

جدول ۱: حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) آزیترومایسین برای ۵ سویه A.baumannii قبل و بعد از غیرفعال سازی فتودینامیکی با رنگ متیلن بلو و تولوئیدن بلو

Strain	MIC before PDI (μg/ml)	MIC after PDI (μg/ml)
A.baumannii (۱)	۶۴	۸
A.baumannii (۲)	۶۴	۸
A.baumannii (۳)	۶۴	۸
A.baumannii (۴)	۶۴	۸
A.baumannii (۵)	۶۴	۸

جدول ۲: حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) ایمپینم برای ۵ سویه A. baumannii قبل و بعد از غیرفعال سازی فتودینامیکی با رنگ متیلن بلو و تولوئیدن بلو

Strain	MIC before PDI (μg/ml)	MIC after PDI (μg/ml)
A.baumannii (۱)	۶۴	۱۶
A.baumannii (۲)	۶۴	۱۶
A.baumannii (۳)	۶۴	۱۶
A.baumannii (۴)	۶۴	۱۶
A.baumannii (۵)	۶۴	۱۶

جدول ۳: حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) سیپروفلوکساسین برای ۵ سویه A.baumannii قبل و بعد از غیرفعال سازی فتودینامیکی با رنگ متیلن بلو و تولوئیدن بلو

Strain	MIC before PDI (μg/ml)	MIC after PDI (μg/ml)
A.baumannii (۱)	۲۵۶	۶۴
A.baumannii (۲)	۲۵۶	۶۴
A.baumannii (۳)	۲۵۶	۶۴
A.baumannii (۴)	۲۵۶	۶۴
A.baumannii (۵)	۲۵۶	۶۴

جدول ۴: حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) جنتامایسین برای ۵ سویه A.baumannii قبل و بعد از غیرفعال سازی فتودینامیکی با رنگ متیلن بلو و تولوئیدن بلو

تشکر و قدردانی

با تشکر از حمایت‌های دانشگاه تهران

References:

1. McConell MJ. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev* 2013; 37: 130-55.
2. Chen YH. Trends in the susceptibility of clinically important resistant bacteria to tigecycline: results from the Tigecycline In Vitro Surveillance in Taiwan study, 2006 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 1452-7.
3. López-Rojas R. *Acinetobacter baumannii* resistant to colistin alters its antibiotic resistance profile: a case report from Spain. *J Infect Dis* 2011; 204: 1147-8.
4. Rolain JM. *Acinetobacter baumannii* resistant to colistin with impaired virulence: a case report from France. *J Infect Dis* 2011; 204: 1146-7.
5. Jin J. Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *BMC Microbiol* 2012; 12: 156.
6. Giacometti A. Comparative activities of cecropin A, melittin, and cecropin A-melittin peptide CA(1-7)M(2-9)NH₂ against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides* 2003; 24: 1315-8.
7. McConnell M.J. Vaccination with outer membrane complexes elicits rapid protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun* 2011; 79: 518-26.
8. Carpenter B.L. Porphyrin-cellulose nanocrystals: a photobactericidal material that exhibits broad spectrum antimicrobial activity. *Photochem Photobiol* 2012; 88: 527-36.
9. Athar M, Mukhtar H, Bickers DR. Differential role of reactive oxygen intermediates in photofrin-I-

شاید بتواند دلیلی برای اثر بهتر متیلن‌بلو در غیرفعال‌سازی فتودینامیکی سویه‌های *A. baumannii* در مقایسه با تولوئیدین‌بلو باشد.

همچنین نتایج این مطالعه نشان داد غیرفعال‌سازی فتودینامیکی سبب تغییر حساسیت آنتی‌بیوتیکی (کاهش MIC) سویه‌های مورد مطالعه شد. اگرچه غیرفعال‌سازی فتودینامیکی در همه سویه‌های مورد مطالعه کاهش بیشتر از ۳ لگاریتم در سلول‌های زنده ایجاد نکرد، اما سبب تغییر حداقل غلظت مهارکنندگی رشد برای آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه شد. به‌طور مثال برای سویه‌های *A. baumannii*، MIC آنتی‌بیوتیک ایمپینم از ۶۴ به ۸ کاهش یافت که طبق دستورالعمل CLSI [۲۲] در محدوده نیمه‌حساس قرار گرفت. این احتمال وجود دارد که غیرفعال‌سازی فتودینامیکی مکانیسم‌های مقاومت یا نفوذپذیری باکتری را دستخوش تغییر کرده‌باشد گرچه تاکنون توجیه دقیق و اثبات این فرضیه حاصل نشده است. همیلین و همکاران (۲۰۱۳) اثر غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با رنگ متیلن‌بلو را به‌همراه آنتی‌بیوتیک ونکومایسین روی یک نوع حشره عفونی شده با *Enterococcus faecium* که به این آنتی‌بیوتیک مقاوم است، مطالعه کردند. آن‌ها دریافتند که همراهی بین غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با آنتی‌بیوتیک ونکومایسین باعث حساس‌تر شدن *E. faecium* به ونکومایسین شد [۲۳]. این درحالی است که مطالعه کاشف و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که اثر غیرفعال‌سازی فتودینامیکی زیر حد کشنده بر تغییر حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *S. aureus* مقاوم و حساس به متی‌سیلین با رنگ‌های متیلن‌بلو و تولوئیدین‌بلو وابسته به سویه بود و باعث افزایش یا کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی شد. اما، به‌طور کلی اثر غیرفعال‌سازی فتودینامیکی زیر حد کشنده با هر دو حساس‌گر نوری متیلن‌بلو و تولوئیدین‌بلو سبب افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین-کلارولانات، آمیکاسین و اریترومایسین و کاهش مقاومت به اگزاسیلین و پیپراسیلین شد [۲۴].

نتیجه‌گیری

این بررسی نشان داد انجام غیرفعال‌سازی فتودینامیکی برای سویه‌های *A. baumannii* مقاوم به کارباینها سبب کاهش تعداد باکتری‌ها در محیط *in vitro* و کاهش MIC آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. به‌نظر می‌رسد که غیرفعال‌سازی فتودینامیکی به نوعی مکانیسم‌های مقاومت باکتری را دستخوش تغییر می‌کند یا سبب افزایش نفوذپذیری دیواره سلولی می‌شود که مکانیسم‌های مولکولی آن تاکنون شناخته نشده است.

پیشنهادها

بررسی تغییرات احتمالی مکانیسم‌های مقاومتی باکتری‌ها به‌واسطه غیرفعال‌سازی فتودینامیکی

and photofrin-II-mediated photoenhancement of lipid peroxidation in epidermal microsomal membranes. *J Invest Dermatol* 1988; 90: 652-7.

10. Jori G, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, Fantetti L, Chiti G, Roncucci G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 468-81.

11. Ashkenazi H. Photodynamic effects of antioxidant substituted porphyrin photosensitizers on gram-positive and -negative bacterial. *Photochem Photobiol* 2003; 77: 186-91.

12. Nitzan Y. Eradication of *Acinetobacter baumannii* by photosensitized agents in vitro. *J Photochem Photobiol B* 1998; 42: 211-8.

13. Tsai T. Chitosan augments photodynamic inactivation of gram positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 1883-90.

14. Ragas X. Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: in vitro and in vivo studies. *Lasers Surg Med* 2010; 42: 384-90.

15. Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC. *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. CRC Press, 2007.

16. Turton JF. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* 2006; 44(8): 2974-6.

17. Wiegand I, Hilpert K, Hancock R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances.

Nature protocols 2008; 3: 163-75.

18. Donnelly RF, McCarron PA, Cassidy CM, Elborn JS, Tunney MM. Delivery of photosensitizers and light through mucus: investigations into the potential use of photodynamic therapy for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis pulmonary infection. *J Control Release* 2007; 117: 217-26.

19. Tegos GP, Hamblin MR. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrate of bacterial multidrug resistance pumps. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 196-203.

20. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Mechanisms of virulence and resistance. *Int J Antimicrob agents* 2010; 35: 219-26.

21. Usacheva MN, Teicher MC, Usachev YM. Interaction of the photobactericides methylene blue and toluidine blue with a fluorophore in *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Lasers Surg Med* 2008; 40(1): 55-61.

22. Cockerill FR. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-First Informational Supplement. M100-S21 standard by Clinical and Laboratory Standard Institute, 2011.

23. Chibebe JJ, Fuchs BB, Caetano P, Sabino CP, Junqueira JC, Jorge AC, Ribeiro MS. Photodynamic and antibiotic therapy impair the pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a whole animal insect model. *PLoS ONE* 2013; 8 (2): e55926.

24. Kashef N, Akbari-Zare M, Kamrava SK. Effect of sub-lethal photodynamic inactivation on the antibiotic susceptibility and biofilm formation of clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2013; 10: 368-73.