Arak Medical University Journal (AMUJ)
2017; 20(121): 1-9

*Original Article*

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

Faegheh Teymori[1], Nour Amirmozafari Sabet[2*]

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. Antibiogram 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 samles was resprctively 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

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۲۰، شماره ۴ (شماره پیاپی ۱۲۱)، تیر ۱۳۹۶، ۹-۱

# بررسی ارتباط بین توانایی تشکیل بیوفیلم و مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های کلینیکی و محیطی *اسینتو باکتر بومانی* در شهر تهران ۱۳۹٤

**فائقه تیموری[۱]، نور امیر مظفری ثابت[۲*]**

۱.کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. استاد، گروه میکروب‌شناسی، 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 توزیع‌شده‌اند. این باکتری‌ها، از کشت پوست، غشاهای مخاطی، ترشحات و محیط بیمارستان جداسازی می‌گردند. *اسینتو باکتر بومانی*، گونه‌ای است که با شیوع بیش‌تری جداسازی می‌شود. سوش‌های *اسینتو باکتر* اغلب در برابر عوامل ضد میکروبی مقاوم هستند.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه به‌صورت میدانی، مشاهده و آزمون صورت گرفت. نمونه ها 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. به‌وسیله روش‌های بیوشیمیایی (OF،SIM،TSI و آزمایش گرم)، ۵۰ نمونه *اسینتوباکتر بومانی* جداسازی شد. در آبان ماه ۱۳۹۴ ،۱۰۰ نمونه‌ی بالینی به روش بیوشیمیایی از بیمارستان امام خمینی جداسازی و داخل پلیت محیط کشت مولر هینتون آگار به آزمایشگاه منتقل شد. آزمون آنتی بیوگرام برای ۱۵۰ نمونه *اسینتوباکتر بومانی* انجام شد. تشکیل بیوفیلم نمونه‌های محیطی و بالینی *اسینتو باکتر بومانی* به روش کشت در پلیت و کونگورد آگار بررسی گردید.

**یافته‌ها:** در نمونه‌های بالینی و خاک، بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به ایمی پنم وبرابر 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:** ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، گروه میکروب شناسی

Email: Mozafari.n@iums.ac.ir

## مقدمه

*اسینتوباکتر بومانی* یک کوکو باسیل گرم منفی غیر تخمیری هوازی متعلق به خانواده موراکسلاسه است(۱). بیشتر مناطق رایج عفونت توسط *اسینتوباکتر بومانی* در ریه و عفونت ادراری و عفونت زخم و سپتی سمی می‌باشد(۲). سوش‌های اسینتو باکتر، 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. کاربانپم‌ها داروی انتخابی در درمان عفونت‌های شدید هستند. علت اصلی ایجاد این مقاومت در باکتری وجود کاربانپماز و مکانیسم‌های دیگر مثل تغییر پروتئین‌های غشای خارجی و غیره است(۵). مقاومت به کاربانپم‌ها در میان *اسینتوباکتر بومانی* می‌تواند به واسطه دو گروه بتالاکتاماز مثل اگزاسیلینازهای هیدرولیز کننده کاربانپم 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 سینرژیسم و هم یاری بین باکتری‌های بیوفیلم در مقاومت آن‌ها در مقابل شرایط نامساعد مؤثراست(۷، ۸).

*اسینتوباکتربومانی* 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 گزارش‌شده که مجموعه‌ای از ژن‌های بسیار متنوع کد کننده مقاومت به داروهای مختلف ازجمله بتالاکتام‌ها، تتراسایکلین‌ها و گلیکوپپتیدها در *اسینتوباکتر* شناسایی‌شده 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 میکروب‌شناسی 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 میکروب‌شناسی 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 زیرآب 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 گرمابه گذاری 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 *اسینتوباکتر بومانی* داده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمابه گذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت از هر یک کلنی، مجدداً کشت خطی داده شد و درون انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرارگرفته شد، این کار با چند بار تکرار متوالی انجام گرفت تا باکتری به‌صورت خالص جمع‌آوری شد.

## جمع‌آوری نمونه بالینی

تعداد ۱۰۰ ایزوله *اسنیتو باکتر 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 هینتون آگار به آزمایشگاه باکتری‌شناسی منتقل شدند.

## ایزوله کردن *اسینتوباکتر بومانی*:

جهت شناسایی و تأیید ایزوله‌های *اسنیتوباکتربومانی* جمع‌آوری‌شدهِ 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 *اسینتوباکتر بومانی*

*اسینتوباکترها* 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 درروی 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 *اسینتوباکتر*، انجام شد.

## بررسی تشکیل بیوفیلم

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 *اسینتوباکتر 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: به‌منظور تهیه یک لیتر از محیط کنگورد آگار،۳۷ گرم از پودر BHI همراه با ۱۰

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 پلیت های 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 ازلحاظ 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 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 *اسنیتو باکتری بومانی* از خاک گلدان‌های بنجامین و شمعدانی جمع‌آوری شد. از تعداد ۳۰ نمونه آب رودخانه فلکه دوم صادقیه، ۲۵ نمونه *اسینتوباکتر بومانی* جمع‌آوری شد. در محیط کشت مکانکی آگار: نمونه‌ها به صورت صاف، صورتی، موکوییدی مشاهده شد. در رنگ‌آمیزی *اسینتوباکتر*، به صورت کوکو باسیل گرم متغیر دیده شد. جهت شناسایی و تأیید ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی جمع‌آوری شدهِ 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 بی‌حرکت بودن در محیط SIM، عدم تخمیر قندها در محیط TSI(قرمز روی قرمز)، رشد در دمای $44C^{\circ}$ انجام شد.

**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 آنتی بیوگرام *اسینتوباکتر 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 آنتی بیوگرام که بر اساس آنتی‌بیوتیک‌های جدول ۱ صورت گرفت نشان داد ۹۲ درصد *اسینتوباکتر 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 *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده و ۲ نمونه باکتری *E.cloi* 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 *اسینتوباکتر بومانی* را به‌عنوان موفق‌ترین بیماری‌زای بیمارستانی در سراسر دنیا شاهد بوده‌ایم. بخشی از این رخداد، مربوط به توانایی بقاء 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 *اسینتوباکتر 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 *اسینتوباکتر بومانی* جداشده 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 الزهرای 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 *اسینتوباکتر* بوده است(۱۸).در این تحقیق آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، سیپروفلوکساسین، جنتامیسین، کوتریماکسازول، کلیستین، سفتازیدیم و ایمی پنم، برای بررسی میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی *اسینتوباکتر بومانی*، در نمونه‌های بالینی و محیطی انجام شد. بیش‌ترین مقاومت در ۱۰۰ نمونه‌ی بالینی *اسینتوباکتر بومانی* به ایمی پنم(۹۲ درصد) و بیش‌ترین حساسیت به کلیستین(۱۰۰ درصد) بود. بیش‌ترین مقاومت در ۲۵ نمونه‌ی خاک به ایمی پنم و سیپروفلوکساسین(۹۲ درصد) و بیش‌ترین حساسیت به جنتامیسین(۱۲ درصد) بود. بیش‌ترین مقاومت در ۲۵ نمونه‌ی آب به ایمی پنم (۹۹/۹ درصد) و بیش‌ترین حساسیت به کلیستین (۹۹/۹ درصد) بود. بررسی که در سال ۲۰۰۹ روی اسینتوباکتر جدا شده از تصفیه‌خانه فاضلاب، آن هاربر میشیگان آمریکا، صورت گرفت، از بین آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شد جهت آنتی بیوگرام، 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

بیش‌تر به آنتی‌بیوتیک حساس هستند(۲۰). مقاومت آنتی‌بیوتیکی که از *اسینتوباکترهای* جدا شده از آب، تشخیص داده شد؛ نشان‌دهنده این است که *اسینتوباکتر* ذاتاً مقاوم نیست و احتمالاً تحت فشار یا دریافت ژن مقاومت کسب کرده است(۲۱). تحقیقی که سال ۲۰۰۲ انجام شد، از ۵۶ نمونه جمع‌آوری‌شده از نمونه‌های محیطی، ۲۲ مورد *اسینتوباکتر* 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 اسینتوباکتر باگذشت 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 کولیستین، سیپروفلوکساسین و آمپی‌سیلین داروهایی مؤثری علیه عفونت *اسینتوباکتر بومانی* می‌باشد. چسبندگی و توانایی تشکیل بیوفیلم در *اسینتوباکتر بومانی*، نقش محوری در میزان پاتوژن بودن و ایجاد عفونت در دستگاه‌های مربوط به پزشکی بازی می‌کند(۲۴). در سال ۹۴بررسی تأثیر اسانس الکلی گیاه مرزه خوزستانی بر روی بیان ژن مرتبط با بیوفیلم *اسینتوباکتربومانی*(bap) به روش Real time PCR صورت گرفت و با توجه به تأثیر مهاری اسانس مرزه خوزستانی علیه ژن بیوفیلم *اسینتوباکتر بومانی* احتمالاً بتوان از این اسانس به‌عنوان مکمل درمانی علیه این باکتری و مهار ژن ویرولانس آن استفاده نمود(۲۵). به‌طورکلی، 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 *اسینتوباکتر بومانی* ،برای ایجاد یک محیط محافظ است که منجر به مشکل شدن نفوذ آنتی‌بیوتیک و توسعه مقاومت می‌شود. در تحقیق حاضر تشکیل بیوفیلم توسط *اسینتوباکتر بومانی*، با دو روش Microtiter plate و کنگورد آگار بررسی شد. که در نمونه‌های *اسینتوباکتر* جداشده از آب،۵۶ درصد تشکیل بیوفیلم در روش کنگورد آگار مشاهده شد. در نمونه‌های جداشده 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 درروش کشت در پلیت که روشی کمی در تشخیص بیوفیلم است در نمونه‌های بالینی ۲۳ درصد ،خاک ۵۳ درصد و آب ۳۱ درصد، بیوفیلم تشکیل دادن.تحقیقی که سال ۲۰۰۸ انجام شد، نمونه‌هایی که بیوفیلم تشکیل ندادن مقاومت بالایی به نتیلین و افلوکساسین نشان دادند و۶۲ درصد نمونه‌ها تولید بیوفیلم داشتند که مقاوم به ایمی پنم و سیپروفلوکساسین بودند(۲۴).

## نتیجه‌گیری

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

عفونت *اسینتوباکتر 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، به‌عنوان‌مثال، 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 اسینتوباکتر، در توسعه

درمان‌های جدید و مؤثرتر برای عفونت‌های اسینتوباکتر کمک خواهد کرد.

## تشکر و قدردانی

با تشکر فراوان از دانشگاه علوم و تحقیقات تهران و کارکنان محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی 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 β-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.

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.

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, Ataee R, Esmaeili D. The Study of Inhibition Effects Satureja khuzestaniea 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 Quaem University Hospital During 2009-2011. Journal of Medical and Rehabilitation Sciences. 2012;1(1):43-6.

18.Fazeli H, Rad TM, Esfahani BN, Pourdad 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 andAeromonas 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

.