

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

خلاصه

مقدمه: با توجه به مقاومت دارویی به‌ویژه مقاومت به کاربامپنم‌ها 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 غیر فعال سازی فتودینامیکی سویه‌های *Acinetobacter baumannii* استفاده شد. سپس حداقل غلظت مهارکننده رشد برای ۴ آنتی بیوتیک آزیترومایسین، ایمپنم، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین قبل و بعد از غیر فعال سازی فتودینامیکی تعیین شد.

یافته‌ها: کاهش لگاریتمی سلول‌های زنده پس از غیر فعال سازی فتودینامیکی با رنگ‌های متیلن بلو و تولوئیدین بلو برای ۵ سویه *A. baumannii* به ترتیب بین $2/4-3/5$ و $2/2-2/9$ بود. همچنین غیر فعال سازی فتودینامیکی سبب کاهش حداقل غلظت مهارکننده رشد آنتی بیوتیک آزیترومایسین، ایمپنم، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین شد.

نتیجه‌گیری: 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*

نسیم کاشف^۱

مهین یحیایی^۲

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: kashefn@khayam.ut.ac.ir

مقدمه

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 آنتی‌بیوتیک‌های 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 [۲-۴]. 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 آنتی‌بیوتیکی را گزارش کرده‌اند که از آن جمله می‌توان پیشرفت‌هایی در زمینه فاژدرمانی [۵]، پپتیدهای ضد میکربی [۶]، واکسیناسیون پروفیل‌اکتیک [۷] و فتودینامیک درمانی [۸] علیه *A. baumannii* را نام برد.

در فتودینامیک درمانی ضد میکروبی یا غیرفعال‌سازی 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 حساس‌گرهای نوری بر روی سلول‌های میکروبی به طور قابل توجهی نسبت به بسیاری از داروهای آنتی‌بیوتیکی متفاوت است، به عنوان مثال عملکرد وسیع‌الطیف که در آن حساس‌گر نوری می‌تواند بر روی باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، انگل‌های تک‌یاخته و ویروس‌ها مؤثر باشد. اثربخشی مستقل از الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی امکان انجام پروتکل‌های غیرفعال‌سازی فتودینامیکی بدون آسیب رساندن به بافت میزبان، یافت نشدن سویه‌های مقاوم به غیرفعال‌سازی فتودینامیکی بعد از چند بار درمان، احتمال کم القاء جهش، استفاده از منابع نوری کم‌هزینه جهت فعال‌سازی حساس‌گرهای نوری، دسترسی آسان و کاربرد راحت آن از دیگر ویژگی‌های غیرفعال‌سازی فتودینامیکی است [۱۰].

فعالیت دو کلاس متفاوت از حساس‌گرهای 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 تولوئیدین‌بلو بر سلول‌های پلانکتون *A. baumannii* شد [۱۳]. در مطالعه Ragas و همکاران اثر ۴ رنگ متفاوت از گروه فنوتیازینیوم (متیلین‌بلو، تولوئیدین‌بلو، متیلین‌بلو جدید و دی‌متیل‌متیلین‌بلو) بر غیرفعال‌سازی فتودینامیکی *A. baumannii* مقاوم به دارو بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که هر ۴ رنگ بر این باکتری اثر فتوتوکسیک داشتند. متیلین‌بلو جدید مؤثرترین رنگ گزارش شد [۱۴].

باتوجه به مطالعات گذشته، هدف از این مطالعه بررسی غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با دو رنگ متیلین‌بلو و تولوئیدین‌بلو 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 آنتی‌بیوتیک آزیترومایسین، ایمپنیم، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین قبل و بعد از غیرفعال‌سازی 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 آنتی‌بیوگرام برای اطمینان از مقاومت به کاربائپنم‌ها، پرایمر ژن مقاومت به کاربائپنم 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

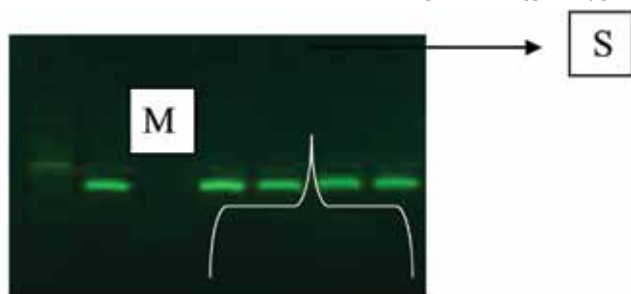
برای هر ۵ سویه جدا شده از نمونه‌ها، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase chain reaction: PCR) انجام گرفت. برای اطمینان از باندهای مشاهده شده محصول PCR تعیین توالی شد.

تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) آنتی‌بیوتیک‌ها

آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده آزیترومایسین، ایمپنیم، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین بودند. پس از تهیه محلول ذخیره از هر آنتی‌بیوتیک 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 آنتی‌بیوتیک تهیه شد. به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه، ۹۵ μ l محیط کشت، ۵ μ l سوسپانسیون میکروبی و ۱۰۰ μ l از هر غلظت آنتی‌بیوتیک اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از ۲۴ ساعت، به روش چشمی MIC برای هر آنتی‌بیوتیک و هر ۵ سویه خوانده شد [۱۷]. چاهک حاوی حداقل غلظت مهارکننده 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

مقاوم به دارو است (شکل ۱).

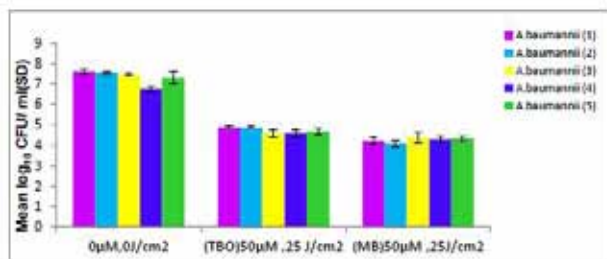


شکل ۱: S: محصول PCR (حضور باند ۳۵۳ bp در ژل الکتروفورز، بیان گر *A. baumannii* مقاوم به کاربامپنم است)، M: مارکر ۱۰۰bp

غیرفعال سازی فتودینامیکی سویه های *A. baumannii* با دو رنگ متیلن بلو و تولوئیدین بلو

نتایج حاصل از انکوباسیون سویه ها با دو رنگ متیلن بلو و تولوئیدین بلو به تنهایی نشان داد این غلظت قادر به کاهش تعداد باکتری های زنده در مقایسه با گروه کنترل نبود ($P > 0.05$). همچنین پرتودهی با دانسیته انرژی 25 J/cm^2 به تنهایی قادر به کاهش در تعداد باکتری های زنده در مقایسه با گروه کنترل نبود ($P > 0.05$).

کاهش لگاریتمی سلول های زنده باکتریایی پس از غیرفعال سازی 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 سلول های زنده پس از غیرفعال سازی 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 غیر فعال سازی فتودینامیکی با دو رنگ متیلن بلو و تولوئیدین بلو برای ۵ سویه *A. baumannii* نشان داده شده است.



نمودار ۱: اثر غیرفعال سازی 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 سویه ها بعد از غیرفعال سازی فتودینامیکی

همان طور که در جدول های ۱ تا ۴ مشاهده می شود، غیرفعال سازی

های غیر فعال سازی فتودینامیکی، MIC برای هر آنتی بیوتیک و هر ۵ سویه مجدداً تعیین شد تا اثر غیرفعال سازی فتودینامیکی بر تغییر الگوی حساسیت ضد میکروبی سویه ها بررسی شود.

آزمون های غیرفعال سازی فتودینامیکی

رنگ های متیلن بلو و تولوئیدین بلو از شرکت سیگما خریداری شدند. منبع نوری مورد استفاده یک لیزر دیود (Azor K30, continuous mode, Russia) با توان خروجی ۳۰ mw و طول موج ۶۵۰ نانومتر بود. از سویه های مورد نظر روی نوترینت آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. از کشت ۲۴ ساعته، سوسپانسیونی مطابق با کدورت ۰/۵ مک فارلند ($1 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$) تهیه شد. از هر سوسپانسیون، ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک های پلیت ۹۶ خانه تلقیح شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رنگ متیلن بلو و تولوئیدین بلو با غلظت نهایی $50 \mu\text{M}$ به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انکوبه شد. سپس چاهک های 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 ۱۰۰ میکرولیتر به پلیت نوترینت آگار منتقل شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. کلنی های رشد کرده بر سطح محیط شمارش شدند. تمام مراحل سه مرتبه برای هر سویه و برای هر دو رنگ متیلن بلو و تولوئیدین بلو عیناً تکرار شد. گروه های کنترل به سه دسته تقسیم شدند: گروهی که هیچ گونه 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.

آزمون های آماری

برای آنالیز داده ها، از نرم افزار SPSS استفاده شد. مقادیر به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین $\log_{10}$ بیان شدند. مقایسه بین میانگین گروه های مختلف با استفاده از آزمون One-Way ANOVA بررسی گردید. مقادیر $P < 0.05$ از لحاظ آماری معنی دار تلقی شدند.

یافته ها

شناسایی سویه های جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه تنفس تحتانی

همه نمونه ها پس از کشت هوازی شامل یک میکروارگانیزم بودند که با انجام تست های بیوشیمیایی، *A. baumannii* شناسایی شد. جهت اطمینان از شناسایی *A. baumannii* مقاوم به کاربامپنم ها از روش PCR استفاده شد که ناحیه اختصاصی ژن bla OXA-51-like کاربامپنما را شناسایی می کرد. حضور باند ۳۵۳ bp نشان دهنده 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 باکتری ها پس از تیمار با حساسگر نوری تولوئیدن بلو و متیلن بلو در غلظت نهایی $50 \mu\text{M}$ با مدت زمان انکوباسیون ۵ دقیقه در معرض پرتو دهی با لیزری با طول موج متناسب با حداکثر جذب حساسگر نوری (دوز نوری 25 J/cm^2) قرار گرفت. به طور میانگین برای ۵ سویه *A. baumannii* با حساسگر نوری متیلن بلو $\log 3/1$ و با حساسگر نوری تولوئیدن بلو $\log 2/6$ کاهش در تعداد باکتری ها مشاهده شد. مطالعه *Ragas* و همکاران (۲۰۱۰) نیز نتایجی مشابه با نتایج مطالعه حاضر داشت. در آن مطالعه کاهش تعداد باکتری های *A. baumannii* در حالت پلانکتون بعد از غیر فعال سازی فتودینامیکی با دو رنگ تولوئیدن بلو و متیلن بلو بین $\log 2-3$ گزارش شد [۱۴]. همچنین Donnelly و همکاران (۲۰۰۷) آزمون های غیر فعال سازی فتودینامیکی را با دو رنگ تولوئیدن بلو و TMP با غلظت 5 mg/ml روی ۵ سویه *P. aeruginosa* جدا شده از بیماران سیستمیک فیبروز انجام دادند. نتایج حاصل از این مطالعه کاهش ۹۹/۹۹ درصد در سویه های مورد آزمون بود، اما از لحاظ لگاریتمی کمتر از حد، کشنده محسوب می شد [۱۸].

این مطلب روشن است که اثر فتوباکتریسیدال رنگ ها از برهمکنش اولیه بین رنگ ها و باکتری ها و سپس جایگزینی رنگ و قدرت اتصال آن به سطح سلول باکتری تأثیر می پذیرد. Hamblin و Tego (۲۰۰۶) نشان دادند که رنگ های فنوتیازینیوم، سوبسترای پمپ های دفع دارو در باکتری های وحشی مقاوم به دارو هستند [۱۹]. از آنجا که در مطالعه حاضر از سویه های وحشی *A. baumannii* استفاده شده است که حتماً دارای چنین پمپ هایی هستند، پمپ کردن رنگ از غشاء خارجی این باکتری ها به محیط خارج می تواند 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 سویه های *A. baumannii* نشان داد که حساسگر نوری متیلن بلو به طور کارآمدتری نسبت به تولوئیدن بلو اثر فتوتوکسیسیستی را نشان می دهد. *A. baumannii* برای زنده ماندن در داخل و خارج از بدن انسان از آهن به عنوان ماده ضروری استفاده می کند و انواع مختلفی از مولکول های پذیرنده آهن از جمله سیدروفورها را تولید می نماید. تعداد مولکول های سیدروفور *A. baumannii* به نسبت سایر باکتری های گرم منفی بیشتر است [۲۰]. از طرفی متیلن بلو $2/5$ برابر تولوئیدن بلو توانایی اتصال به سیدروفور را دارد. متیلن بلو ترجیحاً به سیستم سیدروفور متصل می شود در حالی که تولوئیدن بلو عمدتاً به LPS متصل می شود [۲۱]. این مطلب

فتودینامیکی سبب کاهش حداقل غلظت مهارکننده رشد هر ۴ آنتی بیوتیک مورد آزمون برای هر ۵ سویه *A. baumannii* شد. MIC آنتی بیوتیک آزیترومایسین، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین برای هر ۵ سویه *A. baumannii* قبل از غیر فعال سازی فتودینامیکی در محدوده مقاوم بود که این میزان بعد از غیر فعال سازی فتودینامیکی نیز در همین محدوده قرار گرفت، اما ۴ برابر کاهش غلظت مهارکنندگی رشد را نشان داد. برای آنتی بیوتیک ایمپنم، MIC قبل از غیر فعال 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 ($\mu\text{g/ml}$)	MIC after PDI ($\mu\text{g/ml}$)
<i>A. baumannii</i> (۱)	۳۲	۸
<i>A. baumannii</i> (۲)	۳۲	۸
<i>A. baumannii</i> (۳)	۳۲	۸
<i>A. baumannii</i> (۴)	۳۲	۸
<i>A. baumannii</i> (۵)	۳۲	۸

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

Strain	MIC before PDI ($\mu\text{g/ml}$)	MIC after PDI ($\mu\text{g/ml}$)
<i>A. baumannii</i> (۱)	۶۴	۸
<i>A. baumannii</i> (۲)	۶۴	۸
<i>A. baumannii</i> (۳)	۶۴	۸
<i>A. baumannii</i> (۴)	۶۴	۸
<i>A. baumannii</i> (۵)	۶۴	۸

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

Strain	MIC before PDI ($\mu\text{g/ml}$)	MIC after PDI ($\mu\text{g/ml}$)
<i>A. baumannii</i> (۱)	۶۴	۱۶
<i>A. baumannii</i> (۲)	۶۴	۱۶
<i>A. baumannii</i> (۳)	۶۴	۱۶
<i>A. baumannii</i> (۴)	۶۴	۱۶
<i>A. baumannii</i> (۵)	۶۴	۱۶

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

Strain	MIC before PDI ($\mu\text{g/ml}$)	MIC after PDI ($\mu\text{g/ml}$)
<i>A. baumannii</i> (۱)	۲۵۶	۶۴
<i>A. baumannii</i> (۲)	۲۵۶	۶۴
<i>A. baumannii</i> (۳)	۲۵۶	۶۴
<i>A. baumannii</i> (۴)	۲۵۶	۶۴
<i>A. baumannii</i> (۵)	۲۵۶	۶۴

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

تشکر و قدردانی

با تشکر از حمایت های 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 متیلن بلو در غیرفعال سازی فتودینامیکی سویه های *A. baumannii* در مقایسه با تولوئیدن بلو باشد.

همچنین نتایج این مطالعه نشان داد غیرفعال سازی فتودینامیکی سبب تغییر حساسیت آنتی بیوتیکی (کاهش MIC) سویه های مورد مطالعه شد. اگرچه غیرفعال سازی فتودینامیکی در همه سویه های مورد مطالعه کاهش بیشتر از ۳ لگاریتم در سلول های زنده ایجاد نکرد، اما سبب تغییر حداقل غلظت مهارکنندگی رشد برای آنتی بیوتیک های مورد مطالعه شد. به طور مثال برای سویه های *A. baumannii*، MIC آنتی بیوتیک ایمپینم از ۶۴ به ۸ کاهش یافت که طبق دستورالعمل CLSI [۲۲] در محدوده نیمه حساس قرار گرفت. این احتمال وجود دارد که غیرفعال سازی فتودینامیکی مکانیسم های مقاومت یا نفوذپذیری باکتری را دستخوش تغییر کرده باشد گرچه تاکنون توجیه دقیق و اثبات این فرضیه حاصل نشده است. همبلین و همکاران (۲۰۱۳) اثر غیرفعال سازی فتودینامیکی با رنگ متیلن بلو را به همراه آنتی بیوتیک ونکوماکسین روی یک نوع حشره عفونی شده با *Enterococcus faecium* که به این آنتی بیوتیک مقاوم است، مطالعه کردند. آن ها دریافتند که همراهی بین غیرفعال سازی فتودینامیکی با آنتی بیوتیک ونکوماکسین باعث حساس تر شدن *E. faecium* به ونکوماکسین شد [۲۳]. این درحالی است که مطالعه کاشف و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که اثر غیرفعال سازی فتودینامیکی زیر حد کشنده بر تغییر حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های *S. aureus* مقاوم و حساس به متی سیلین با رنگ های متیلن بلو و تولوئیدن بلو وابسته به سویه بود و باعث افزایش یا کاهش مقاومت آنتی بیوتیکی شد. اما، به طور کلی اثر غیرفعال سازی فتودینامیکی زیر حد کشنده با هر دو حساس گر نوری متیلن بلو و تولوئیدن بلو سبب افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک های آموکسی سیلین-کلارولانات، آمیکاسین و اریتروماکسین و کاهش مقاومت به اگزاسیلین و پیپراسیلین شد [۲۴].

نتیجه گیری

این بررسی نشان داد انجام غیرفعال سازی فتودینامیکی برای سویه های *A. baumannii* مقاوم به کارباینها سبب کاهش تعداد باکتری ها در محیط *in vitro* و کاهش MIC آنتی بیوتیک ها می شود. به نظر می رسد که غیرفعال سازی فتودینامیکی به نوعی مکانیسم های مقاومت باکتری را دستخوش تغییر می کند یا سبب افزایش نفوذپذیری دیواره سلولی می شود که مکانیسم های مولکولی آن تاکنون شناخته نشده است.

پیشنهادها

بررسی تغییرات احتمالی مکانیسم های مقاومتی باکتری ها به واسطه غیرفعال سازی 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, Coppelotti 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.Tegoes 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.