

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 غیرفعال 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 غیرفعال 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 غیرفعال سازی فتودینامیکی سبب کاهش حداقل غلظت مهارکننده رشد آنتی بیوتیک آزیترومایسین، ایمپنم، 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*

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: kashfn@khayam.ut.ac.ir

مقدمه

باتوجه به مطالعات گذشته، هدف از این مطالعه بررسی غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با دو رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو 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، ایمپینم، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین قبل و بعد از غیر فعال‌سازی 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 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) آنتی‌بیوتیک‌ها

آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده آزیترومایسین، ایمپینم، 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.

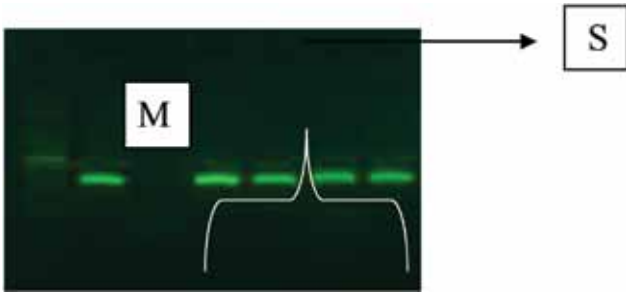
برای هر سویه، سوسپانسیونی با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد. سری رقت به طور جداگانه برای هر آنتی‌بیوتیک تهیه شد. به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه، ۹۵ μ l محیط کشت، ۵ μ l سوسپانسیون میکروبی و ۱۰۰ μ l از هر غلظت آنتی‌بیوتیک اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از ۲۴ ساعت، به روش چشمی MIC برای هر آنتی‌بیوتیک و هر ۵ سویه خوانده شد [۱۷]. چاهک حاوی حداقل غلظت 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 سی‌سال 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 [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 آنتی‌بیوتیکی را گزارش کرده‌اند که از آن جمله می‌توان پیشرفت‌هایی در زمینه فازدرمانی [۵]، پپتیدهای ضد میکروبی [۶]، واکسیناسیون پروفیلاکتیک [۷] و فتودینامیک‌درمانی [۸] علیه *A. baumannii* را نام برد.

در فتودینامیک‌درمانی 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 غیر فعال‌سازی فتودینامیکی بدون آسیب رساندن به بافت میزبان، یافت نشدن سویه‌های مقاوم به غیر فعال‌سازی 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 غیر فعال‌سازی 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 تولوئیدن‌بلو بر سلول‌های پلانکتون *A. baumannii* شد [۱۳]. در مطالعه Ragas و همکاران اثر ۴ رنگ متفاوت از گروه فنوتیازینیوم (متیلن‌بلو، تولوئیدن‌بلو، متیلن‌بلو جدید و دی‌متیل‌متیلن‌بلو) 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. متیلن‌بلو جدید مؤثرترین رنگ گزارش شد [۱۴].

مقاوم به دارو است (شکل ۱).

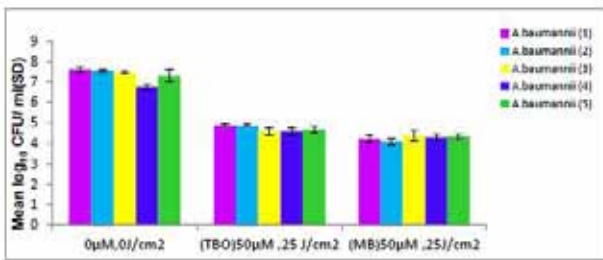


شکل ۱: S: محصول PCR (حضور باند ۳۵۳ bp در ژل الکتروفورز، بیان گر *A. baumannii* مقاوم به کارباپنم است)، M: مارکر ۱۰۰bp

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

نتایج حاصل از انکوباسیون سویه‌ها با دو رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو 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 ۲/۴-۳/۵ (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 ۲/۲-۲/۹ (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 فعال‌سازی فتودینامیکی با دو رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو 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 غیر فعال سازی 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 تولوئیدن‌بلو 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 سویه‌های مورد نظر روی نوترینت آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری 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 چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه تلقیح شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو 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 چاهک‌های مورد نظر به مدت ۵ دقیقه تحت تابش دستگاه لیزر (25 J/cm^2) قرار گرفتند. پس از پایان زمان تابش، چند مرتبه پیتتاژ 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. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. کلنی‌های رشد کرده بر سطح محیط شمارش شدند. تمام مراحل سه مرتبه برای هر سویه و برای هر دو رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو 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 به‌صورت 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 ۳۵۳ bp نشان‌دهنده وجود این سویه

بحث

مطالعه حاضر جهت ارزیابی اثر غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با استفاده از حساسگرهای نوری تولوئیدن‌بلو و متیلن‌بلو بر روی ۵ سویه *A. baumannii* جدا شده از دستگاه تنفس تحتانی انجام شد. سوسپانسیون باکتری‌ها پس از تیمار با حساسگر نوری تولوئیدن‌بلو و متیلن‌بلو در غلظت نهایی $50 \mu\text{M}$ با مدت زمان انکوباسیون ۵ دقیقه در معرض پرتودهی با لیزری با طول موج متناسب با حداکثر جذب حساسگر نوری (دوز نوری 25 J/cm^2) قرار گرفت. به‌طور میانگین برای ۵ سویه *A. baumannii* با حساسگر نوری متیلن‌بلو $\log 3/1$ و با حساسگر نوری تولوئیدن‌بلو $\log 2/6$ 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 غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با دو رنگ تولوئیدن‌بلو و متیلن‌بلو بین $\log 2-3$ گزارش شد [۱۴]. همچنین Donnelly و همکاران (۲۰۰۷) آزمون‌های غیرفعال‌سازی فتودینامیکی را با دو رنگ تولوئیدن‌بلو 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 $99/99$ 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. Hamblin و Tego (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 به‌دست آمده (اثر فتوتوکسیک کمتر از حد کشنده دو رنگ تولوئیدن‌بلو و متیلن‌بلو) در مطالعه حاضر باشد.

در مطالعه حاضر میانگین کاهش لگاریتمی در سویه‌های *A. baumannii* نشان داد که حساسگر نوری متیلن‌بلو به‌طور کارآمدتری نسبت به تولوئیدن‌بلو اثر فتوتوکسیسیته را نشان می‌دهد. *A. baumannii* 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 گرم‌منفی بیشتر است [۲۰]. از طرفی متیلن‌بلو $2/5$ برابر تولوئیدن‌بلو توانایی اتصال به سیدروفور را دارد. متیلن‌بلو ترجیحاً به سیستم سیدروفور متصل می‌شود در حالی که تولوئیدن‌بلو 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 غیرفعال‌سازی فتودینامیکی در محدوده مقاوم بود که این میزان بعد از غیرفعال‌سازی فتودینامیکی نیز در همین محدوده قرار گرفت، اما ۴ برابر کاهش غلظت مهارکنندگی رشد را نشان داد. برای آنتی‌بیوتیک ایمپینم، MIC قبل از غیرفعال‌سازی فتودینامیکی در محدوده مقاوم بود که بعد از آن در محدوده نیمه‌حساس 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 غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو

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) ایمپینم برای ۵ سویه *A. baumannii* قبل و بعد از غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو

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 غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو

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 غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با رنگ متیلن‌بلو و تولوئیدن‌بلو

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 کرده باشد گرچه تاکنون توجیه دقیق و اثبات این فرضیه حاصل نشده است. همیلین و همکاران (۲۰۱۳) اثر غیرفعال‌سازی فتودینامیکی با رنگ متیلن‌بلو را به همراه آنتی‌بیوتیک ونکومايسين 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 ونکومايسين باعث حساس‌تر شدن *E. faecium* به ونکومايسين شد [۲۳]. این در حالی 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-کلاولانات، آمیکاسین و اریترومايسين و کاهش مقاومت به اگزا‌سیلین و پیپراسیلین شد [۲۴].

نتیجه‌گیری

این بررسی نشان داد انجام غیرفعال‌سازی فتودینامیکی برای سویه‌های *A. baumannii* مقاوم به کار با پنم‌ها 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, 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. Tego 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.