

## Evaluation of Antibiotic Resistance Pattern of Meropenem and Piperacillin-Tazobactam in Multi Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates by Flow Cytometry Method

Nahid Rahimi<sup>1</sup>, Sahar Honarmand Jahromy\*<sup>2</sup>, Shohreh Zare Karizi<sup>3</sup>

1. MSc Student, Department of Microbiology, School of Biological Sciences, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
2. Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
3. Assistant Professor, Department of Genetics, School of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran



### Article Information

Article Subject:  
Antibiotic Resistance

 10.30699/ijmm.13.3.194

### Corresponding author:

**Sahar Honarmand Jahromy**,  
Assistant Professor, Department  
of Microbiology, School of  
Biological Sciences, Varamin-  
Pishva Branch, Islamic Azad  
University, Varamin, Iran

Email:  
[sahar\\_hj2@yahoo.com](mailto:sahar_hj2@yahoo.com)

Use your device to scan  
and read the article online



### Abstract

**Background and Aims:** Flow cytometry is a rapid method that can analyze thousands of cells per second and can be used for determination of microbial populations and determination of bacterial antimicrobial susceptibility. In this study antibiotic resistance pattern of *Acinetobacter baumannii* isolates by flow cytometer was evaluated.

**Materials and Methods:** 55 isolates of *A. baumannii* were isolated from clinical specimen of patients and were identified by biochemical tests. Antibiotic resistance patterns were studied by disc diffusion method and MDR strains were selected. MIC of Meropenem -Tazobactam and Piperacillin were determined. Also antibiotic resistance pattern of isolates was determined by coloring with Rhodamine-123 and flow cytometry. Excel software and STDV test were used to calculate the standard deviation of antibiotic resistance and MIC results. To evaluate the agreement between the results of antibiotic resistance pattern using disk diffusion methods and the MIC and Flow cytometry category agreement was used.

**Results:** 98% of isolates were MDR. The MIC ranges for meropenem were 8 - 256 µg/mL and for Piperacillin-tazobactam were 128-1024 µg/mL. By flow cytometry it was demonstrated that at concentrations of 8, 4 and 2 µg/mL of meropenem, only 1.96%, 1.44% and 0.59%, of cells were killed respectively. At concentrations of 64, 128 and 16 µg/mL of piperacillin, 13.8%, 11.3% and 5.9% of cells were killed respectively. Reducing the number of living bacteria was observed with increasing concentrations of both antibiotics.

**Conclusion:** The similarity between the results of flow cytometry and both agar and broth antibacterial susceptibility methods showed flow cytometry as a reliable and rapid test that can be used for this purpose.

**Keywords:** Antibiotic susceptibility, MDR, *Acinetobacter baumannii*, flow cytometer

Received: 2019/08/09

Accepted: 2019/10/02

Available online: 2019/10/02

Copyright © 2019. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

### How to cite this article:

Rahimi N, Honarmand Jahromy S, Zare Karizi S. Evaluation of Antibiotic Resistance Pattern of Meropenem and Piperacillin- Tazobactam in Multi Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates by Flow Cytometry Method. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (3) :194-209

### Download citation:

[BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

### Send citation to:

 [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

## Introduction

Standard Antibiotic Susceptibility Test (AST) include disk diffusion, broth dilution and manual and automated alternative methods that take 18 to 24 hours to get a good result. Faster methods such as DNA and mass spectrometry-based methods do not always provide good information in antibiotic susceptibility and have limitation (11,12). This limitation can be achieved by means of a device based on identification of bacterial physiological changes in the presence of antibiotics and by using biodegradable fluorescent markers, as flow cytometry (14,15). Flow cytometry (FCM), is a device that passes cells or micrometer particles through the point of contact where the laser beams affect them, and the light that they absorb which is based on the intrinsic or sub-physical properties of the particle itself, Scatter or diffuse, and this light can be measured (1,2). Today, flow cytometry is a tool for bacterial analysis, detection, enumeration, determining changes in cellular function, metabolic activity, cell viability and antibiotic susceptibility of bacteria (3,32). Over the past decade, the presence of *Acinetobacter baumannii*, especially multiple drug resistant *A. baumannii* (MDRAB), has been recognized as the most important pathogen and cause of hospital mortality worldwide. Rapid identification of these strains is essential for the treatment of their disease (17,18). The aim of this study was to investigate the antibiotic resistance pattern of multidrug-resistant *A. baumannii* isolates

against meropenem and piperacillin-tazobactam using flow cytometry.

## Methods

This cross-sectional descriptive study was performed on 55 *A. baumannii* strains randomly isolated from clinical specimens of 230 patients admitted to Milad Hospital, Tehran, from November to April 2017. Gram staining and biochemical tests were used for identifying *A. baumannii* strains. Antibiotic susceptibility testing was performed by disk diffusion methods according to CLSI 2017 against 7 antibiotics (Table 1). Strains that were resistant to more than two classes of antibiotics were included as MDR strains. Microdilution broth method was used to determine Minimum Inhibitory Concentration of meropenem and piperacillin-tazobactam. For Flow cytometry 10 isolates of multidrug-resistant *A. baumannii* were selected. The concentrations of meropenem and piperacillin-tazobactam for *A. baumannii* isolates were 2, 4, 8 µg/mL and 16, 64, 128 µg/mL. The incubation time of antibiotic treatment on bacterial suspension was 4 hours. Then the suspension was centrifuged and stained by 2 µg/mL of Rhodhamin123 fluorescent dye. The results were analyzed by Flow cytometer FACSCalibur using Side scatter (SSC), forward scatter (FSC) and green fluorescent light (FL1) parameters with 488-nm wavelength helium laser beam. Data analysis was performed for all methods.

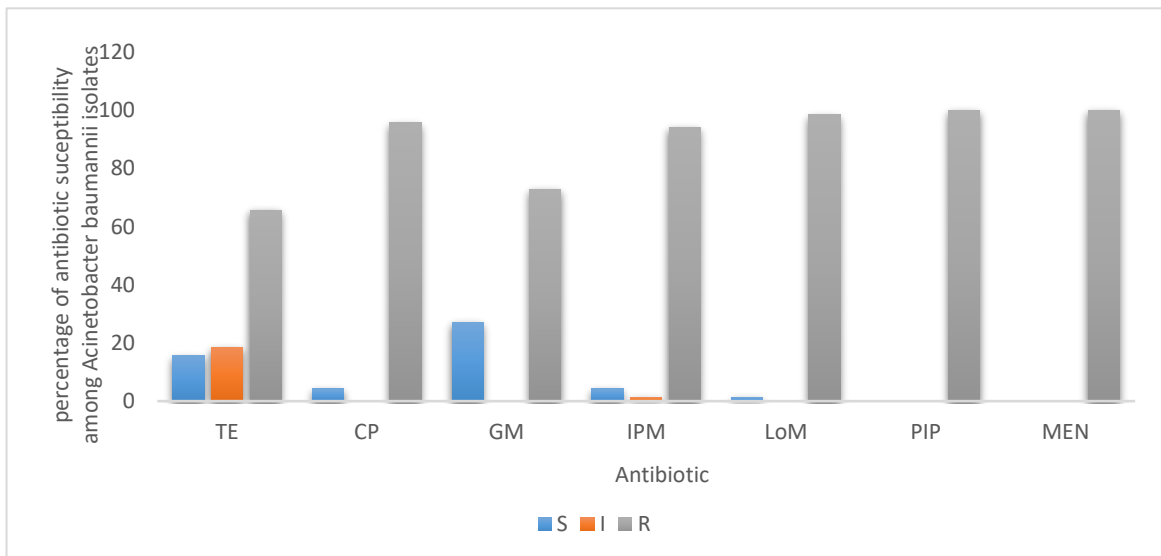
Table 1. Antibiotic resistance pattern of *Acinetobacter baumannii* isolates based on according to the CLSI 2017

Antimicrobial Agent	SYMBOL	DISK (µg)	S	I	R
Meropenem (Carbapenem)	(MEN)	10	>23	20_22	<19
Ciprofloxacin (FLUOROQUINOLONES)	(CP)	5	>21	2_6	<15
Gentamycin (AMINOGLYCOSIDES)	(GM)	10	>15	13_14	<12
Piperacillin-Tazobactam (Beta lactam)	(Pip- T)	100/1	>21	18_20	<17
levofloxacin (FLUOROQUINOLONES)	(LVF)	5	>16	11_15	<10
Tetracyclin (Tetracycline)	(TE)	30	>15	12_14	<11
Imipenem (Carbapenem)	(IMP)	10	>18	14_17	<13

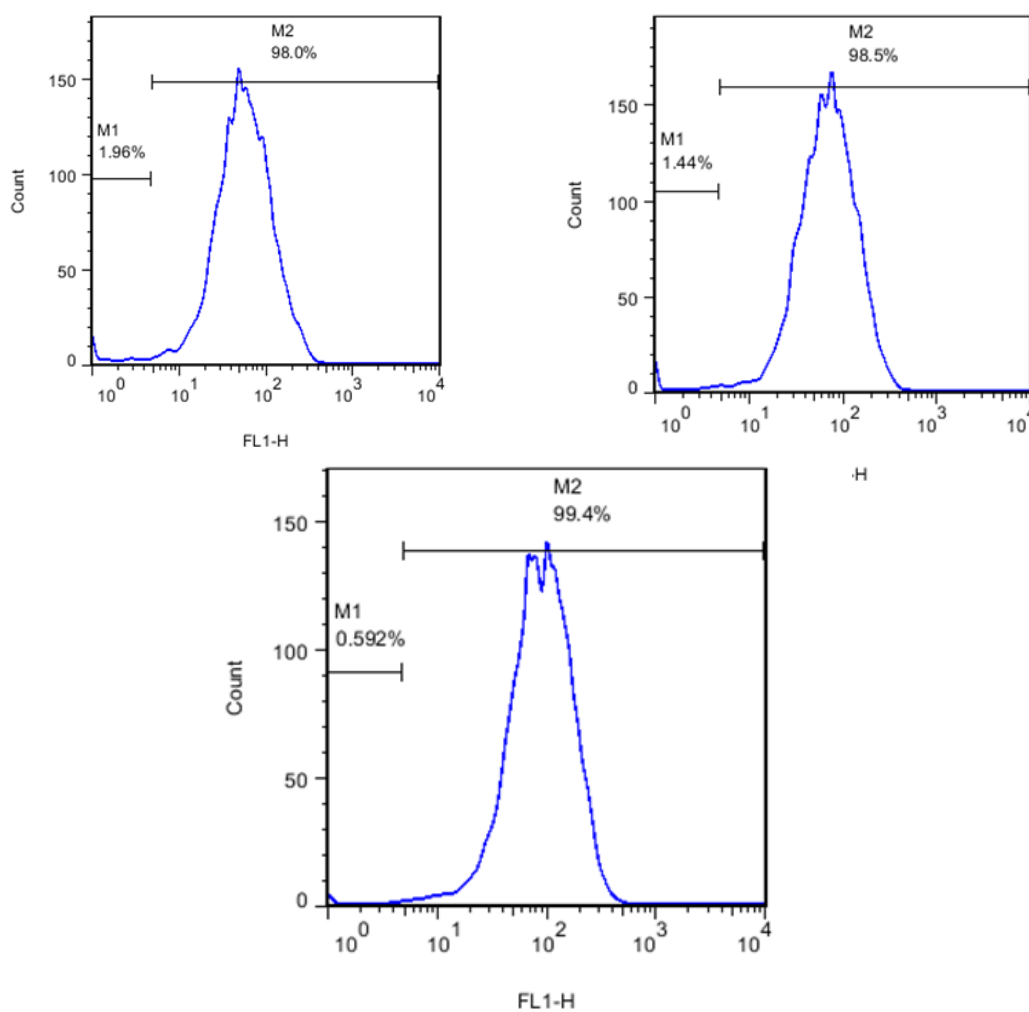
## Results

The average antibiotic resistance of *A. baumannii* strains to meropenem, ciprofloxacin, gentamicin, piperacillin-tazobactam, levofl-

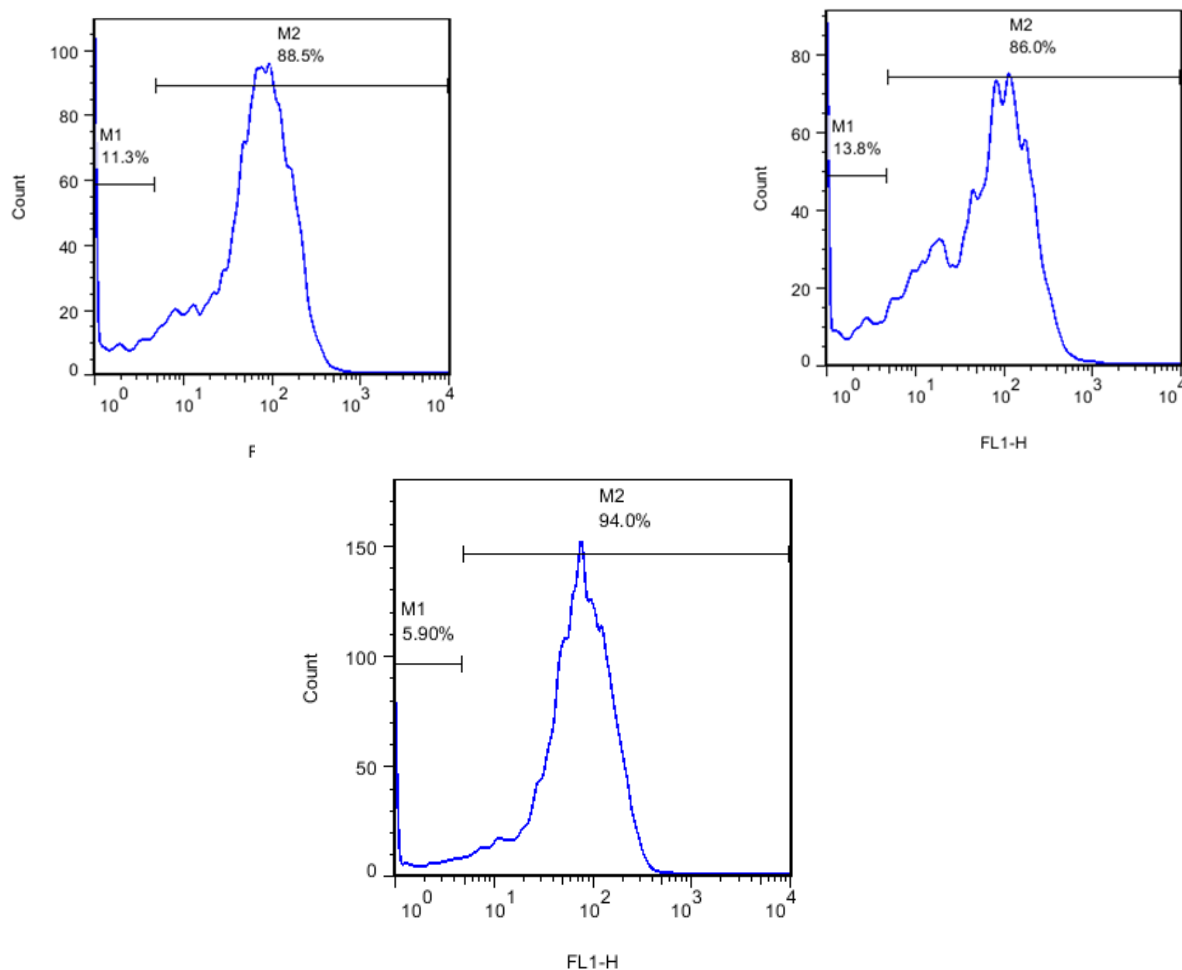
oxazine, tetracycline and imipenem were 100%, 95.7%, 72.8%, 100%, 100%, 65.7% and 94.2%, respectively (Figure 1). 98% of *A. baumannii* isolates were included as MDR strains.



**Figure1:** Antibiotic resistance profile of *Acinetobacter baumannii* isolates



**Figure 2.** Histogram of Flow cytometry analysis for meropenem



**Figure 3.** Histogram of Flow cytometry analysis for Piperacillin –Tazobactam

The results of antibiotic MIC of isolates showed that the mean MIC of Meropenem antibiotic was 105.14 with a standard deviation of 84.101 and for the piperacillin-tazobactam antibiotic 1236.11 with a standard deviation of 774.124. 37/37% of the strains had MIC 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for Meropenem and only 90/90% of isolates had MIC of 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . For piperacillin-tazobactam the highest MIC was 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and higher.

In Flow cytometry section at concentrations of 2, 4 and 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of meropenem antibiotic, the cell death rate was 1.96%, 1.44% and 0.59%, respectively (Figure 2).

At concentrations of 16, 64 and 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of piperacillin-tazobactam antibiotic, the cell death rate was 1.96%, 1.44% and 0.59%, respectively (Figure 2).

The results of flow cytometry to determine the resistance pattern of 10 MDR isolates of *A. baumannii*, showed that more than 98% of cells survived the effects of meropenem and piperacillin-tazobactam and all isolates showed resistance to meropenem and piperacillin tazobactam. Comparison of the results of antibiotic resistance pattern determination with all three methods and the Category agreement (CA) between methods were finally 100% for both antibiotics.

## Discussion

Previous studies in Iran have shown that carbapenem resistance of *A. baumannii* strains is increasing. In a systematic study by Moradi *et al.* In 2015, the rate of resistance to meropenem and imipenem antibiotics between 2001- 2007 increased by 64.3% and 51.1% to 81.5% and

76.5% between 2012 and 2013, respectively (24). Excessive resistance to carbapenem, which was also reported 100% in this study, is a serious alarm for the treatment of infections associated with *A. baumannii*. One of the most important reasons is using inappropriate antibiotics. Also, quick and accurate tests to determine the antibiotic susceptibility of the bacteria and the need for rapid administration of an initial antimicrobial empirical treatment is very important when the physician is awaiting the results of sensitivity testing with standard time-consuming. Flow cytometry can analyze diverse microbial populations in a suspension and showing microbial diversity in a short time. In this study the results obtained by flow cytometer in measuring antibiotic resistance pattern were obtained 4 hours after preparation of microbial suspension resulting from overnight culture on bacterial colonies. More than 98% of bacterial cells survived after exposure to different concentrations of meropenem and piperacillin-tazobactam that was in agreement with the results of disk diffusion and MIC method for determination of antibiotic resistance pattern of *A. baumannii* isolates (CA 100%). This illustrates the importance of using a flow cytometer as a rapid and sensitive method to determine the antibiotic resistance pattern of bacterial isolates. However, the use of other antibiotics such as gentamicin, which in this study showed less resistance, and the determination of antibiotic resistance pattern of higher number of bacterial strains by flow cytometry is suggested in future studies.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank Mr. Omid Hosseini, technician of Research Laboratory of Shahid Beheshti University who helped them in this study.

### **Conflict of Interest**

The authors reported no conflict of interest.



## بررسی الگوی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و پیپراسیلین-تازوباکتام در جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم چند دارویی با روش فلوسایتومتری

ناهید رحیمی<sup>۱</sup>، سحر هنرمند جهرمی<sup>۲\*</sup>، شهره زارع کاریزی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران
۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران
۳. استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** فلوسایتومتری روشی سریع است که می‌تواند هزاران سلول را در هر ثانیه تحلیل کند و برای تعیین زنده‌مانی جمعیت‌های میکروبی و حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها استفاده شود. در این مطالعه، الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* با روش فلوسایتومتری بررسی شد.

### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۱۸

پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۱۰

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۰۷/۱۰

### موضوع:

مقاومت آنتی‌بیوتیکی

IJMM1398;13(3): 194-209

**مواد و روش کار:** ۵۵ جدایه *اسینتوباکتر بومانی* از ۲۳۰ نمونه بالینی بیماران جداسازی و با تست‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار در دیسک تعیین و جدایه‌های MDR انتخاب شدند. حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و پیپراسیلین تازوباکتام برای جدایه‌های MDR تعیین شد. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها نسبت به این دو آنتی‌بیوتیک با رنگ‌آمیزی رودامین ۱۲۳ و روش فلوسایتومتری تعیین گردید و نتایج مقایسه شد. برای محاسبه انحراف معیار مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و نتایج MIC آنتی‌بیوتیک‌ها از تست STDEV در برنامه اکسل استفاده شد. به منظور ارزیابی توافق بین نتایج تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش‌های انتشار در دیسک، MIC و فلوسایتومتری از روش معیار توافق یا Category Agreement (CA) استفاده شد.

### نویسنده مسئول:

### سحر هنرمند جهرمی

استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران

### پست الکترونیک:

[sahar\\_hj2@yahoo.com](mailto:sahar_hj2@yahoo.com)

**یافته‌ها:** ۹۸ درصد جدایه‌ها MDR بودند. میزان MIC مروپنم از ۸-۲۵۶  $\mu\text{g/mL}$  و پیپراسیلین ۱۲۸-۱۰۲۴ بود. با فلوسایتومتری نشان داده شد که در غلظت‌های ۲، ۴ و ۸ مروپنم، به ترتیب فقط ۱/۹۶ درصد، ۱/۴۴ درصد و ۰/۵۹ درصد سلول‌ها کشته شدند. در غلظت‌های ۱۶، ۶۴ و ۱۲۸ پیپراسیلین تازوباکتام به ترتیب ۱۳/۸ درصد، ۱۱/۳ درصد و ۵/۹ درصد سلول‌ها کشته شدند. کاهش تعداد باکتری‌های زنده با افزایش غلظت‌های هر دو آنتی‌بیوتیک مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** تطابق میان نتایج روش فلوسایتومتری و هر دو روش تعیین حساسیت ضد میکروبی آگار و میکرودايلوشن برات نشان داد که فلوسایتومتری می‌تواند به عنوان روشی سریع و قابل دسترس می‌تواند برای این منظور استفاده شود.

**کلید واژه‌ها:** الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مقاومت چندگانه دارویی، *اسینتوباکتر بومانی*، فلوسایتومتری

کپی‌رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

### مقدمه

آزمایشگاهی برای پیوند اعضاء و تشخیص بیماری‌های عفونی به خود اختصاص دهد (۳، ۲). با توجه به اندازه گیری چند پارامتری چندین هزار سلول منفرد در هر ثانیه توسط فلوسایتومتر، این وسیله به عنوان یک روش سریع برای آنالیز جزئیات میکروارگانیسم‌ها معرفی شده است (۲). فلوسایتومتری داده‌های کمی برای اندازه و گرانولیتة سلول را از طریق پارامتر سیگنال‌های light scattering و اطلاعات کمی سیگنال‌های فلورسنس روی سطح آنتی‌ژن‌ها یا اجزای درون سلولی

فلوسایتومتری (Flow cytometry) یا FCM دستگاهی است که سلول‌ها یا ذرات میکرومتری را از نقطه‌ی تماسی که اشعه لیزر روی آنها اثر می‌گذارد عبور داده و نوری که ذرات جذب می‌کنند بر اساس خصوصیات ذاتی یا فرعی فیزیکی خود ذره، پراکنده یا منتشر می‌شود و این نور قابل اندازه‌گیری است (۱). سرعت و دقت بالای این تکنیک، موجب شد تا خیلی زود جایگاه ویژه‌ای را در رشته‌های مختلفی چون آسیب شناسی، هماتولوژی، ایمنی شناسی، ژنتیک، بررسی‌های

جهش‌های مقاومت و ژن‌های مقاومت نیز هستند که قادر به زنده ماندن در حضور درمان‌های آنتی‌بیوتیکی با استفاده از سایر مکانیسم‌های غیرژنتیکی هستند (۱۳). این محدودیت در تست‌ها می‌تواند با استفاده از یک وسیله بر پایه ی شناسایی تغییرات فیزیولوژی باکتریایی ناشی از حضور آنتی‌بیوتیک‌ها و با استفاده از نشانگرهای فلورسنت زیست‌پذیر که توسط مطالعات متعدد ثابت شده است، صورت پذیرد که همان روش فلوسایتومتری است. مزیت عمده این روش شناختی این است که برخی از تغییرات فیزیولوژیکی ناشی از آنتی‌بیوتیک‌ها مدت‌ها قبل از مهار رشد قابل مشاهده هستند (۱) ساعت در برابر ۱ یا ۲ روز). قابلیت‌های فلوسایتومتری امکان تعیین نوع میکروبی در کشت‌ها را فراهم کرده است. جذب غشایی و سایر شناساگرهای زنده بودن میکروبی می‌تواند سلول به سلول سنجش شود. FCST (Flow Cytofluorometric Susceptibility Test) پاسخ‌های سلولی را در مقابل اثرات محیطی و ترکیبات مختلف می‌تواند به صورت MIC (Minimum Inhibitory Concentration) و MBC (Minimum Bactericidal concentration) مشخص کند و این مسئله آن را تبدیل به تکنیکی سریع، حساس و تکرارپذیر کرده است (۱۴). در سال ۱۹۹۴، Mason و همکاران با استفاده از پتانسیل جذب رنگ دارای بار منفی (dye bisdibutylbarbituric acid) تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، جنتامیسین و سیپروفلوکسازین را با فلوسایتومتر بررسی کردند (۱۴). Suller تغییرات در یکپارچگی غشای سیتوپلاسمی به وسیله پروپیدیوم دید و پروب آنیونیک بیس (۳.۱) دیبوتیل باربیتوریک اسید) تریمتین اکسونول (DiBAC<sub>4</sub>(3)) را به منظور اندازه‌گیری تغییرات در پتانسیل غشا استفاده کردند (۱۵). در سال ۲۰۰۲، Gauthier و همکاران از فلوسایتومتری برای تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جدا شده از عفونت مجاری ادراری از روش فلوسایتومتری و رنگ فلورسنت بیس- ۱ و ۳ دی بوتیل باربیتوریک اسید تری متیل اگزانول (DIBAC<sub>4</sub>(3)) استفاده کردند (۱۶). Nuding و همکاران نیز برای تشخیص و تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها از فلوسایتومتری و تعیین پتانسیل غشای باکتریایی استفاده کردند (۲).

در طی دهه گذشته، حضور اسپنتوباکتر بومانی به‌خصوص سویه‌های MDR / اسپنتوباکتر بومانی Multiple drug resistant Acinetobacter baumannii (MDRAB) به عنوان مهم‌ترین عامل بیماری‌زا و مرگ‌ومیر بیمارستانی در سراسر دنیا شناخته شده است (۱۷). بخشی از این رخداد، مربوط به توانایی بقای این میکروارگانیسم در محیط‌های بیمارستانی و کسب مکانیسم مقاومت و ایجاد

مانند اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها یا لیپیدها و یا پتانسیل غشایی و جریان یون‌ها فراهم می‌سازد (۲). در فلوسایتومتر، دو پارامتر light scatter و فلورسنت، خصوصیات ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی سلول‌های منفرد را مشخص می‌کنند که این ویژگی‌ها با یک سیستم کامپیوتر تحلیل می‌شود (۴). امروزه فلوسایتومتر ابزاری است که برای تحلیل باکتریایی از تشخیص و شمارش باکتری تا تعیین تغییرات در عملکرد سلولی و فعالیت متابولیکی و حتی شناسایی ژن‌هایی که تحت شرایط خاص در حالات خاصی قرار می‌گیرند به کار گرفته می‌شود (۵). پیشرفت‌های اخیر FCM همراه با نسل جدید تحقیقات سلولی، این تکنیک را برای تحلیل واکنش‌های فیزیولوژیکی در باکتری‌ها مناسب ساخته است. مطالعات مختلفی به بررسی نحوه ی به‌کارگیری FCM برای تمایز شرایط فیزیولوژیکی در باکتری‌ها از جمله واکنش به آنتی‌بیوتیک‌ها و دیگر مواد شیمیایی سیتوتوکسیک و فاکتورهای فیزیکی، متابولیسم پاتوژن میزبان، تمایز سلولی در حین تشکیل بیوفیلم و مکانیسم‌های هدایت رشد و توسعه ی مسیرهایی مانند اسپورزایی پرداخته‌اند (۷، ۶). کاربردهای فلوسایتومتری در میکروبیولوژی از سال ۱۹۷۰ شناخته شده است. در این مطالعات Hutter و Paau و همکاران مقدار DNA باکتری را با پروپیدیوم دید و پروتئین کل سلولی را با ایزوتیوسیانات فلوروسین اندازه گیری کردند (۸، ۹). سایر کاربردهای FCM در میکروبیولوژی شامل بررسی چرخه سلولی، تمایز دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و تعیین زنده‌مانی باکتری‌ها است (۱۰). علی‌رغم کاربردهای وسیع فلوسایتومتری، جایگاه این تکنیک تنها در بخش‌های هماتولوژی و ایمنی‌شناسی به‌خوبی تثبیت شده است و استفاده از آن در میکروبیولوژی بالینی هنوز نادر است.

روش‌های استاندارد تست حساسیت آنتی‌بیوتیک (Antibiotic Susceptibility Test) یا AST شامل روش‌های انتشار در دیسک یا رقت در محیط مایع و روش‌های جایگزین دستی و خودکار مانند ETest و VITEK 2 هستند. بیشتر این روش‌ها حداقل غلظت آنتی‌بیوتیک را که قادر به مهار رشد گونه باکتریایی است تعیین می‌کنند (۱۱). در نتیجه، میانگین زمان‌های لازم برای بدست آوردن یک نتیجه مناسب ۱۸ تا ۲۴ ساعت طول می‌کشد (۱۲). در دو دهه گذشته، روش‌های سریعتر AST مانند تست‌های مبتنی بر اساس DNA و روش‌های مبتنی بر اسپکترومتری جرمی توسعه یافته‌اند. با این حال، این روش‌ها همیشه اطلاعات مربوط به حساسیت آنتی‌بیوتیکی را به خوبی ارائه نمی‌دهند. برای مثال، تست‌های مبتنی بر DNA، که اساس مولکولی داشته و بر پایه ی جهش‌های ژن‌های مقاومت هستند خیلی مناسب نیستند. علاوه بر این، باکتری‌های فاقد

گرمخانه‌گذاری با رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد مانند کاتالاز، اکسیداز، کشت در محیط‌های TSI (شرکت مرک، آلمان)، MRVP (شرکت مرک، آلمان)، اوره (شرکت مرک، آلمان)، و تست‌های OF، لایزین، بایل اسکولین و رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس شناسایی شدند. داروها و مداخله‌گرها در این مطالعه استفاده نشد.

### تست تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی و تعیین سویه‌های مقاوم چنددارویی

تست تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی (آنتی‌بیوگرام) به روش انتشار در دیسک و بر اساس استانداردهای CLSI 2017 نسبت به ۷ آنتی‌بیوتیک با استفاده از کشت بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) انجام گرفت. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (پادتن طب، ایران) که شامل ایمی پنم ۱۰ میکروگرم، تتراساکلین ۳۰ میکروگرم، جنتامیسین ۱۰ میکروگرم، سیپروفلوکسازین ۵ میکروگرم، پیراسیلین تازوباکتام ۱۰۰/۱۰ میکروگرم و مروپنم ۱۰ میکروگرم و لووفلوکسازین ۵ میکروگرم استفاده شد. نتایج آنتی‌بیوگرام ایزوله‌ها بر اساس استاندارد CLSI 2017 و با توجه به اندازه قطر هاله عدم رشد اطراف آنتی‌بیوتیک‌ها، به صورت مقاوم، نیمه‌حساس و حساس گزارش شد (جدول ۱). از سویه استاندارد/سینتوباکتر بومانی ATCC19606 به عنوان سویه کنترل کیفی استفاده شد. سویه‌هایی که به بیش از دو کلاس آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند به عنوان سویه‌های MDR معرفی شدند.

عفونت‌های حاد، به ویژه در بیماران بدحال است به طوری که امروزه، شاهد پیدایش سویه‌هایی با مقاومت جهانی و حتی مقاوم به کولیسیتین بوده که درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری را با محدودیت جدی مواجه کرده است (۱۸). شناسایی سریع سویه‌های مقاوم چندگانه دارویی/سینتوباکتر بومانی در بیمارستان‌ها و مراکز درمانی در سراسر جهان کمک بزرگی به پاکسازی بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها از وجود چنین سویه‌هایی می‌کند. هدف از مطالعه حاضر بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های سینتوباکتر بومانی مقاوم چنددارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و پیراسیلین تازوباکتام با روش فلوسایتومتري و استفاده از رنگ رودامین ۱۲۳ است.

### مواد و روش‌ها جمع آوری نمونه

این مطالعه مقطعی-توصیفی روی ۲۳۰ نمونه بالینی شامل تراشه و زخم بیماران بستری در بخش‌های بیمارستان میلاد تهران به طور تصادفی در تاریخ آبان تا فروردین ماه ۹۶-۱۳۹۵ انجام گرفت. معیار ورود بیماران به مطالعه، بستری شدن در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان بود. نمونه‌گیری با رضایت بیمار و پس از تکمیل پرسشنامه انجام گرفت. کد اخلاق مربوط به نمونه‌های مورد مطالعه IR.IAU.VARAMIN.REC.1397.006 است. نمونه‌های بالینی روی محیط‌های کشت بلاد آگار و مک‌کانگی آگار، به منظور شناسایی سویه‌های/سینتوباکتر بومانی کشت داده شده و پس از ۴۸-۲۴ ساعت

جدول ۱. تعیین الگوی مقاومت ایزوله‌های/سینتوباکتر بومانی بر اساس اندازه قطر هاله عدم رشد اطراف آنتی‌بیوتیک‌ها بر اساس استاندارد CLSI

SYMBOL	Antimicrobial Agent	DISK (µg)	S	I	R
(MEN) مروپنم	Meropenem (Carbapenem)	۱۰	>۲۳	۲۰-۲۲	<۱۹
(cp) سیپروفلوکسازین	Ciprofloxacin (Fluoroquinolones)	۵	>۲۱	۲-۶	<۱۵
(GM) جنتامیسین	Gentamycin (AMINOGLYCOSIDES)	۱۰	>۱۵	۱۳-۱۴	<۱۲
(PIP-T) پیراسیلین تازوباکتام	Piperacillin-Tazobactam (Beta lactam)	۱۰۰/۱۰	>۲۱	۱۸-۲۰	<۱۷
(levofloxacin) لووفلوکسازین	Fluoroquinolones	۵	>۱۶	۱۱-۱۵	<۱۰
(TE) تتراسایکلین	Tetracyclin (Tetracycline)	۳۰	>۱۵	۱۲-۱۴	<۱۱
(IPM) ایمی پنم	Imipenem (Carbapenem)	۱۰	>۱۸	۱۴-۱۷	<۱۳

برای تعیین MIC آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و پیراسیلین، تازوباکتام (سیگما، آمریکا) تهیه شده و رقت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها با روش برات میکرودايلوشن آماده شد. در این روش از رقت‌های ۱۰۲۴-۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و پیراسیلین

تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد (minimum inhibitory concentration (MIC) آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و پیراسیلین - تازوباکتام



برای انجام فلوسایتومتری نمونه کنترل منفی شامل سلول‌های کشته شده از طریق جوشاندن سوسپانسیون سلولی یا استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه بود.

**آماده کردن رنگ رودامین ۱۲۳ برای رنگ آمیزی سوسپانسیون**

#### باکتریایی

مقدار ۲ میکروگرم بر میلی لیتر رودامین ۱۲۳ در محلول (1Mm EDTA با pH=8) حل شد و محلول حاصل در ظرفی که نور به درون آن نفوذ نمی‌کرد نگهداری شد. یکی دیگر از روش‌های نگهداری رنگ رودامین ۱۲۳ تهیه محلول استوک رودامین در اتانول ۱۰۰ درصد و ذخیره‌سازی آن در ۲۰ درجه سلسیوس و مکانی بدون نور است. برای انجام مراحل فلوسایتومتر محلول‌های کار در ویال‌های کوچک آماده شده و در یخ قرار داده می‌شوند تا کمترین میزان تخریب در رنگ صورت گیرد.

#### انجام فلوسایتومتری

پس از انجام کلیه مراحل فلوسایتومتری شامل فیکس کردن نمونه‌ها و رنگ‌آمیزی باکتری‌ها با رودامین ۱۲۳ آنالیز نتایج توسط دستگاه فلوسایتومتر نوع Face calibre Flocytometer (Becton Dickinson، آمریکا) به صورت بررسی میزان جذب رنگ رودامین در باکتری‌های زنده و مرده / اسپینتوباکتریومانی و باکتری *E. coli* به عنوان شاهد، اندازه‌گیری شد. در این دستگاه اشعه لیزر هلیوم با طول موج ۴۸۸ نانومتر استفاده شده است. پارامترهای به کار رفته در فلوسایتومتری شامل Forward scatter (FSC) برای تعیین اندازه سلولی با ولتاژ ۳۶۰ ولت، Side Scatter (SSC) برای تعیین گرانیولیت سلولی با ولتاژ ۴۸۵ ولت و نور سبز فلورسنت (FL1) بود. برای تعیین میزان جذب رنگ رودامین ۱۲۳ ولتاژ ۶۰۰ ولت به کار برده شد. برای هر نمونه ۲۰۰۰ سلول در هر سنجش آنالیز شد. تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار مولتی گراف (Multigraph software) که در خود دستگاه فلوسایتومتر قرار داشت انجام گرفت. اختلاف بین فلورسنت سبز و Fc از طریق Multiparameter Data Analysis Software تحلیل شد.

#### تحلیل آماری

از آمار توصیفی شامل فراوانی، درصد میانگین، انحراف معیار (Standard Deviation) برای شرح و توصیف داده‌ها استفاده شد. برای محاسبه انحراف معیار مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و نتایج MIC آنتی‌بیوتیک‌ها از تست STDEV در برنامه اکسل استفاده شد. از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ (SPSS-IBM-Statistics-20-with-Fix Pack-1-x86/x64) و برای مقایسه اعداد از آزمون کای اسکور استفاده

تازوباکتام استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون برات (مرک، آلمان) به تمام چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه افزوده شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه به ردیف اول میکروپلیت ۹۶ خانه اضافه شد و به صورت رقت‌های متوالی، آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه تا آخرین ردیف رقیق گردید. جهت به دست آوردن تعداد CFU/ml باکتری، سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند به میزان ۱/۱۰۰، رقیق شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به چاهک‌ها افزوده شد (تعداد نهایی باکتری CFU/ml  $5 \times 10^5$  است). پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت، انکوبه شدند. اولین چاهکی که در آن رشدی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت مهار باکتری (MIC) تعیین گردید. علاوه بر این، برای اطمینان و جلوگیری از خطای دید در حین آزمایش OD=۰.۶۲۰ تمامی چاهک‌ها با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (شرکت Biotek ساخت کشور آمریکا) محاسبه شد. خانه‌ای که ۹۰ درصد کاهش در جذب نوری حاصل از رشد باکتری را نشان داد، غلظت MIC90 است. لازم به ذکر است این آزمون با سه بار تکرار انجام شد. در این آزمون به منظور کنترل محیط کشت به عنوان بلانک از محیط کشت خالی (بدون آنتی‌بیوتیک و سلول باکتری) استفاده گردید.

#### فلوسایتومتری و تعیین زنده بودن باکتریایی در حضور

#### آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و پپیراسیلین تازوباکتام با رنگ آمیزی رودامین ۱۲۳

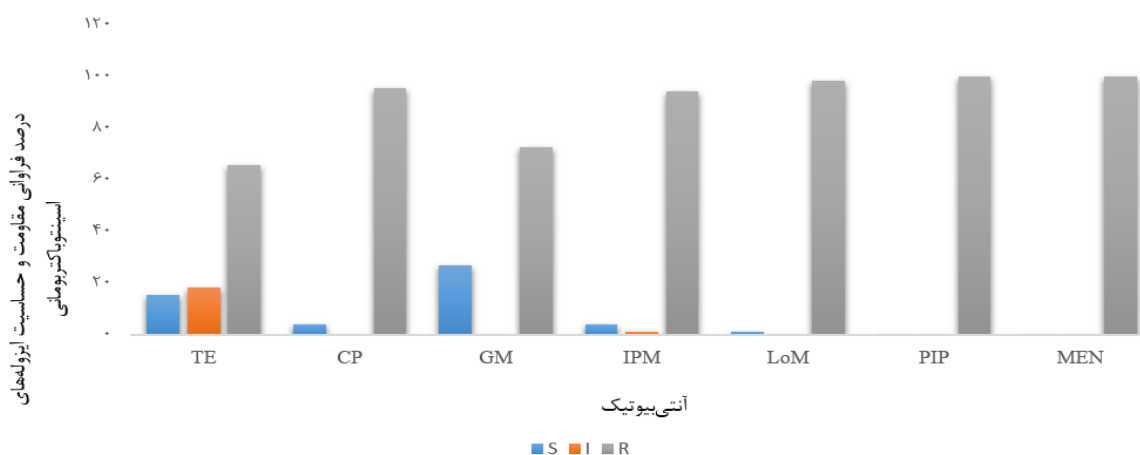
#### آماده‌سازی نمونه باکتریایی برای انجام فلوسایتومتری

ابتدا سوسپانسیون نیم مک فارلند از ۱۰ جدایه باکتری / اسپینتوباکتریومانی مقاوم چند دارو و باکتری / شریشیا کلی ATCC ۲۵۹۲۲ به عنوان سوپه کنترل تهیه شد. غلظت‌های مورد مطالعه آنتی‌بیوتیک مروپنم ۲ و ۴ و ۸ میکروگرم بر میلی لیتر و پپیراسیلین تازوباکتام ۱۶ و ۶۴ و ۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر در نظر گرفته شد. برای / شریشیا کلی سوپه ۲۵۹۲۲، ۱ و ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر انتخاب شدند. زمان تأثیر غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک بر سوسپانسیون باکتریایی و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس چهار ساعت انتخاب شد. پس از این مدت، سوسپانسیون حاوی باکتری و آنتی‌بیوتیک به لوله‌های مخصوص فلوسایتومتری منتقل شدند و به مدت ۱۰ دقیقه با دور  $1000 \times g$  سانتریفوژ شدند. رسوب حاصله جدا شد و محلول رویی دور ریخته شد. به رسوب باقی مانده به میزان ۲ میلی لیتر محلول ۵ میلی مولار بافر فسفات (Phosphate-Buffered Saline) PBS اضافه شد و مجدداً ۱۰ دقیقه در دور  $1000 \times g$  سانتریفوژ شدند. رسوب حاصله جدا شده و به آن ۱ میلی لیتر رنگ رودامین ۱۲۳ (سیگما، آمریکا) اضافه شد.

آلمان، اوره (شرکت مرک، آلمان)، و تست‌های OF، لایزین، بایل اسکولین و رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس است.

### تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی*

با توجه به نتایج به دست آمده (شکل ۱)، میانگین مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم، سیپروفلوکسازین، جنتامیسین، پپراسیلین تازوباکتام، لووفلوکسازین، تتراسایکلین و ایمی پنم به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۹۵/۷ درصد، ۷۲/۸ درصد، ۱۰۰ درصد، ۹۸/۵ درصد، ۶۵/۷ درصد و ۹۴/۲ درصد گزارش شد. ۹۸ درصد جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* به ۳ کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاومت نشان دادند و به عنوان سویه‌های MDR انتخاب شدند.



شکل ۱. نمودار توزیع فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی*

تتراسایکلین (TE)، سیپروفلوکسازین (CP)، جنتامیسین (GM)، ایمی پنم (IPM)، لووفلوکسازین (LOM)، پپراسیلین تازوباکتام (PIP-T)، مروپنم (MEN)

### بررسی الگوی مقاومت *اسینتوباکتر بومانی* به

#### آنتی‌بیوتیک مروپنم با دستگاه فلوسایتومتري

نتایج فلوسایتومتري برای جدایه *اسینتوباکتر بومانی* در بررسی تعداد باکتری‌های کشته شده در غلظت‌های ۸ و ۴ و ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک مروپنم نشان داد که در غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر که هیستوگرام جذب رنگ رودامین آن در شکل ۲-الف نشان داده شده است، میزان سلول‌های کشته شده ۱/۹۶ درصد و در غلظت ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر که هیستوگرام جذب رنگ رودامین آن در شکل ۲-ب نشان داده شده است ۱/۴۴ درصد و در غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر که هیستوگرام جذب رنگ رودامین آن در شکل ۲-ج نشان داده شده ۰/۵ درصد است. نتایج برای ۱۰ ایزوله *اسینتوباکتر بومانی* نشان داد که بیش از ۹۸ درصد باکتری‌ها در غلظت‌های مورد مطالعه مروپنم مقاومت نشان

شد. سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. به منظور ارزیابی توافق بین نتایج تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و پپراسیلین تازوباکتام با استفاده از روش‌های انتشار در دیسک، حداقل غلظت مهارکننده رشد یا MIC و فلوسایتومتري از روش معیار توافق یا Category Agreement (CA) استفاده شد.

### یافته‌ها

تعداد ۵۵ جدایه *اسینتوباکتر بومانی* از نمونه‌های بالینی مورد مطالعه با انجام تست‌های بیوشیمیایی جداسازی و شناسایی شدند. نتایج تست‌های بیوشیمیایی *اسینتوباکتر بومانی* کاتالاز، اکسیداز، کشت در محیط‌های TSI (شرکت مرک، آلمان)، MRVP (شرکت مرک،

### آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و پپراسیلین تازوباکتام

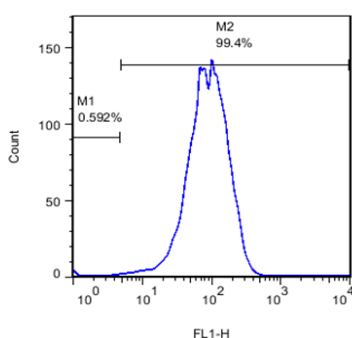
بر اساس استاندارد CLSI، مقایر  $MIC \leq 8 \mu\text{g/mL}$  و  $MIC \leq 128 \mu\text{g/mL}$  به عنوان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و پپراسیلین تازوباکتام در ۵۵ ایزوله *اسینتوباکتر بومانی* در نظر گرفته شد. میانگین MIC آنتی‌بیوتیک مروپنم ۱۰۵/۱۴ با انحراف معیار ۸۴/۰۱۸ و برای آنتی‌بیوتیک پپراسیلین تازوباکتام ۱۲۳۶/۱۱ با انحراف معیار ۷۷۴/۱۲۴ گزارش شد. ۳۷/۱۰ درصد سویه‌ها، برای آنتی‌بیوتیک مروپنم MIC  $64 \mu\text{g/mL}$  داشتند که بالاترین فراوانی را در بین ایزوله‌ها داشت و تنها ۲/۹۰ درصد ایزوله‌ها  $MIC \leq 8 \mu\text{g/mL}$  داشتند. برای آنتی‌بیوتیک پپراسیلین تازوباکتام بیشترین فراوانی مربوط به  $MIC \leq 1024 \mu\text{g/mL}$  و بالاتر بود.

می‌دهد در غلظت ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر که هیستوگرام جذب رنگ رودامین شد (شکل ۳-الف)، میزان سلول‌های کشته شده ۱۳/۸ درصد است؛ در غلظت ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر که هیستوگرام جذب رنگ رودامین ۱۲۳ شد (شکل ۳-ب)، ۱۱/۳ درصد بود؛ در غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر که هیستوگرام جذب رنگ رودامین ۱۲۳ شد (شکل ۳-ج)، ۵/۹ درصد است؛ یعنی، بیش از ۹۵ درصد باکتری‌ها در غلظت‌های مورد مطالعه پیراسیلین تازوباکتام مقاومت نشان دادند. با این حال، یک کاهش تعداد باکتری زنده با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک مشاهده شد.

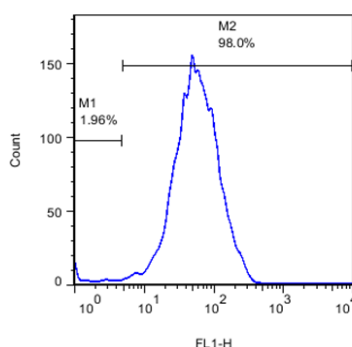
دادند. با این حال، کاهش جزئی در تعداد باکتری زنده با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک مشاهده شد.

### بررسی الگوی مقاومت اسپینتوباکتر بومانی به آنتی‌بیوتیک پیراسیلین تازوباکتام با دستگاه فلوسایتومتری

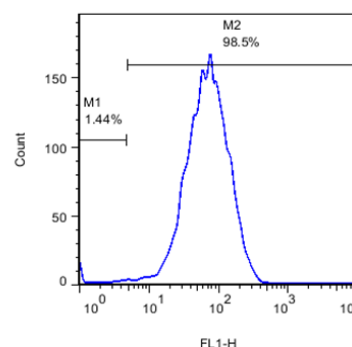
نتایج فلوسایتومتری برای جدایه اسپینتوباکتر بومانی در بررسی تعداد باکتری‌های کشته شده در غلظت‌های ۱۲۸، ۶۴، و ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک پیراسیلین تازوباکتام نشان



(ج)

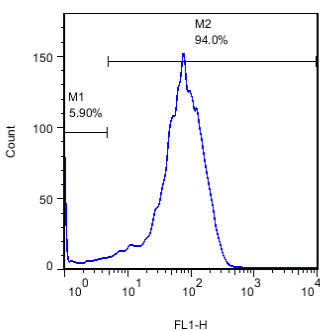


(ب)

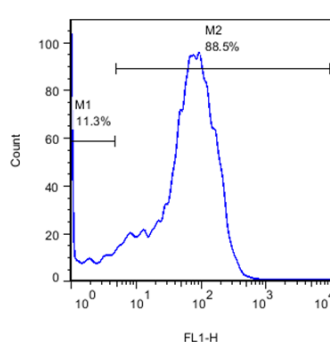


(الف)

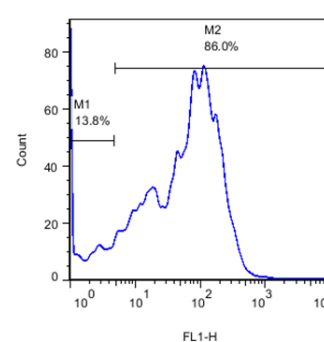
شکل ۲. الف: هیستوگرام جذب رنگ رودامین ۱۲۳ در یک جدایه اسپینتوباکتر بومانی در غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک مروپنم. ب: هیستوگرام جذب رنگ رودامین ۱۲۳ در باکتری‌های مورد مطالعه در غلظت ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک مروپنم. ج- هیستوگرام جذب رنگ رودامین ۱۲۳ در باکتری‌های مورد مطالعه در غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک مروپنم. M1 درصد جذب رنگ توسط باکتری‌های مرده M2 درصد جذب رنگ توسط باکتری‌های زنده



(ج)



(ب)



(الف)

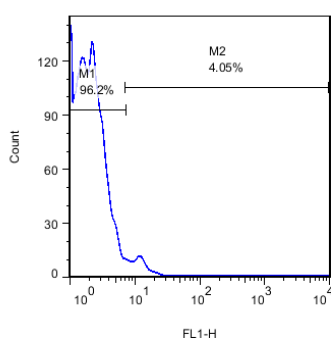
شکل ۳. الف: هیستوگرام جذب رنگ رودامین ۱۲۳ در یک جدایه اسپینتوباکتر بومانی در غلظت ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک پیراسیلین تازوباکتام. ب: هیستوگرام جذب رنگ رودامین ۱۲۳ در باکتری‌های مورد مطالعه در غلظت ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک پیراسیلین تازوباکتام. ج: هیستوگرام جذب رنگ رودامین ۱۲۳ در باکتری‌های مورد مطالعه در غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک پیراسیلین تازوباکتام M1 درصد جذب رنگ توسط باکتری‌های مرده، M2 درصد جذب رنگ توسط باکتری‌های زنده.

غلظت‌های ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک پیراسیلین تازوباکتام که هیستوگرام جذب رنگ رودامین رودامین شده است (شکل ۴-ج)، نشان می‌دهد میزان سلول‌های کشته شده ۹۶/۲ درصد است و فقط ۴ درصد سلول‌ها زنده ماندند.

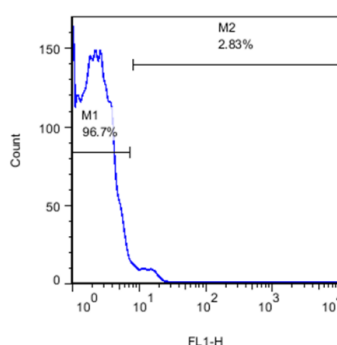
پس از بررسی نتایج فلوسایتومتری برای تعیین الگوی حساسیت و مقاومت ۱۰ جدایه MDR/سینتوباکتر بومانی نتایج نشان داد که بیش از ۹۸ درصد سلول‌ها پس از تأثیر غلظت‌های مورد مطالعه مروپنم و پیراسیلین تازوباکتام زنده ماندند و همه ۱۰ جدایه /سینتوباکتر بومانی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و پیراسیلین تازوباکتام با روش فلوسایتومتری مقاومت نشان داد. مقایسه نتایج تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با هر سه روش و بررسی معیار توافق بین روش‌ها در نهایت CA ۱۰۰ درصد برای هر دو آنتی‌بیوتیک گزارش شد.

## نتایج بررسی الگوی مقاومت سویه/شریشیا کلی ۲۵۹۲۲ به عنوان شاهد نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و پیراسیلین تازوباکتام با روش فلوسایتومتری

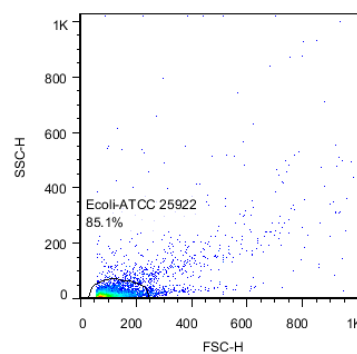
در نمودار نقطه‌ای تهیه شده از سوسپانسیون حاوی باکتری /شریشیا کلی بدون تأثیر غلظت‌های مناسب آنتی‌بیوتیک‌ها با روش فلوسایتومتری و پارامترهای FSC و SSC، میزان سلول‌های زنده ۸۵/۱ درصد مشخص شد (شکل ۴-الف). نتایج فلوسایتومتری در بررسی تعداد باکتری‌های کشته شده /شریشیا کلی در غلظت‌های ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک مروپنم که هیستوگرام جذب رنگ رودامین شده است (شکل ۴-ب)، میزان سلول‌های کشته شده را ۹۶/۷ درصد نشان داد. یعنی فقط ۲/۸۳ سلول‌ها زنده ماندند. اما نتایج فلوسایتومتری در بررسی تعداد باکتری‌های کشته شده در



(ج)



(ب)



(الف)

شکل ۴. الف: تعیین فراوانی سلول‌های زنده /شریشیا کلی ۲۵۹۲۲ براساس پارامترهای FSC و SSC؛ ب: هیستوگرام جذب رنگ رودامین ۱۲۳ در باکتری /شریشیا کلی در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک مروپنم؛ ج: هیستوگرام جذب رنگ رودامین ۱۲۳ در باکتری /شریشیا کلی در غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک پیراسیلین تازوباکتام.

می‌شود و منجر به مرگ و میر بالغ بر ۲۳ درصد بیماران بستری در بیمارستان‌ها و ۴۳ درصد بیماران تحت مراقبت‌های ویژه می‌شود (۲۱). در مطالعه حاضر اغلب سویه‌ها MIC ۶۴  $\mu\text{g/mL}$  برای آنتی‌بیوتیک مروپنم و ۱۰۲۴  $\mu\text{g/mL}$  برای آنتی‌بیوتیک پیراسیلین تازوباکتام داشتند که نشان از مقاومت بسیار بالای سویه‌های /سینتوباکتر بومانی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه بود که با نتایج حاصل از روش انتشار در دیسک که مقاومت به این دو آنتی‌بیوتیک را ۱۰۰ درصد نشان داد همخوانی داشت. ۹۸ درصد سویه‌های /سینتوباکتر بومانی به ۳ کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاومت نشان دادند و به عنوان سویه‌های MDR انتخاب شدند. نتایج این مطالعه با یافته‌های مطالعه Karbasizade و همکاران که اعلام کردند،

## بحث

/سینتوباکتر بومانی عامل طیف وسیعی از بیماری‌های عفونی است اما اغلب مجاری تنفسی، خون و زخم‌ها را درگیر می‌کند. این باکتری، سومین عامل پنومونی از طریق ونتیلاتورها و نهمین عامل عفونت‌های خونی در بیمارستان‌ها است (۱۹). وجود کاتترهای وریدی و ادراری، شدت بیماری، ماندن طولانی‌مدت در بیمارستان و نگهداری در بخش مراقبت‌های ویژه و جراحی، از مهم‌ترین فاکتورهای خطر ابتلا به عفونت‌های مرتبط با /سینتوباکتر بومانی هستند (۲۰). به دلیل بروز مقاومت چندارویی (MDR) و مقاومت وسیع آنتی‌بیوتیکی pan drug resistance (PDR)، اغلب درمان این نوع عفونت‌ها با مشکل مواجه

سلول‌های کشته شده به ترتیب ۱۳/۸ درصد، ۱۱/۳ درصد و ۵/۹ درصد بود. کاهش تعداد باکتری زنده با افزایش غلظت هر دو آنتی‌بیوتیک مشاهده شد. نتایج فلوسایتومتر برای سویه شاهد نشان داد که تعداد باکتری‌های کشته شده در غلظت‌های ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک مروپنم ۹۶/۷ درصد است و در غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک پپراسیلین میزان سلول‌های کشته شده ۹۶/۲ درصد است. نتایج فلوسایتومتر طی ۴ ساعت به دست آمد. رودامین ۱۲۳ که یک رنگ کاتیونی لیپوفیلیک است از جمله پراب‌های فلورسنت متصل شده به غشای سلولی هستند که به عنوان ترکیباتی برای سنجش اثرات دارویی توسط فلوسایتومتر استفاده شده است. این رنگ‌ها درون سلول‌های باکتریایی بر اساس اختلاف در بار بین دو طرف غشای سلولی تجمع می‌کند (۲۷، ۱۳).

Mason و همکاران با استفاده از جذب رنگ dye trimethine oxonol (۳-bisdibutylbarbituric acid) و فاکتور Fc فلوسایتومتر توانستند تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، جنتامیسین و سیپروفلوکساسین را در عرض ۲ تا ۵ ساعت از یک پلیت حاوی کشت باکتریایی بسته به گونه و نوع آنتی‌بیوتیک بررسی کنند. آنها گزارش دادند که این زمان بستگی به زمان لازم برای فاز پایدار در محیط مایع دارد (۱۴). Walberg و همکاران برای سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیک باکتری مانند میکوباکتريا از فلوسایتومتر و جذب رنگ oxonol DiBAC4(3) استفاده کردند و نشان دادند زمانی که صرف این سنجش شد در مقایسه با روش رادیواکتیو نشان‌دار کردن کرین در محیط مایع که برای بررسی رشد میکوباکتريا استفاده می‌شده و نیاز به صرف روزها و هفته‌ها برای سنجش داشته، کمتر است (۲۸). طی مطالعه Gauthier، ۶ سویه کنترل ATCC و ۴۱ ایزوله بالینی و جدا شده از نمونه ادرار شامل استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی، سودوموناس آئروجینوزا، کلبسیلا پنومونیه، پروتئوس میرابیلیس، اتروکوکوس فکالیس و استفالوکوکوس اپیدرمیتیس و ساپروفیتیکوس تحت تأثیر ۱۲ آنتی‌بیوتیک قرار گرفتند و با روش‌های رایج تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و فلوسایتومتری، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک آنها تعیین شد. نتایج به دست آمده در روش‌های انتشار در دیسک، میکرودايلوشن برات و فلوسایتومتری ۹۳/۹ درصد مطابقت داشت (۱۶). در تحقیق حاضر بیش از ۹۸ درصد سلول‌ها پس از تأثیر غلظت‌های مورد مطالعه مروپنم و پپراسیلین تازوباکتام زنده ماندند و همه ۱۰ جدایه/اسینتوباکتر بومانی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و پپراسیلین تازوباکتام با روش فلوسایتومتری مقاومت نشان دادند. نتایج تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با هر سه روش انتشار

اکثر سویه‌های اسینتوباکتر بومانی جدا شده در ایران نسبت به داروهای خط اول درمان شامل آمینوگلیکوزیدها (جنتامیسین، آمیکاسین) سفت‌زیدیم، فلوروکینولون‌ها (سپیروفلوکساسین) و کارباپنم‌ها (ایمی‌پنم و مروپنم) مقاومت نشان می‌دهند، مطابقت دارد (۲۲). در مطالعه Ardebili و همکاران نیز مشخص شد به طور کلی ۵۴ درصد از ایزوله‌ها حداقل نسبت به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاومت مقاومت MDR نشان دادند و فراوانی مقاومت نسبت به جنتامیسین ۶۴ درصد و سیپروفلوکساسین و سفت‌زیدیم ۸۸ درصد می‌باشد که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد (۲۳). در ایران، مطالعات نشان داده مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های اسینتوباکتر بومانی روزبه‌روز در حال افزایش است به طوری که در یک مطالعه سیستمیک توسط Moradi و همکاران، میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و ایمی‌پنم که بین سال‌های ۲۰۰۱-۲۰۰۷، ۶۴/۳ درصد و ۵۱/۱ درصد بود به ۸۱/۵ درصد و ۷۶/۵ درصد بین سال‌های ۲۰۱۳-۲۰۱۲ افزایش یافته است (۲۴). در مطالعه Ghasemian و همکاران میزان مقاومت/اسینتوباکتر بومانی به کلیستین و ایمپنم به ترتیب ۸ و ۱۰۰ درصد بود (۲۵). افزایش بیش از حد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند کارباپنم‌ها که در این مطالعه نیز ۱۰۰ درصد گزارش شد، زنگ خطر جدی برای درمان عفونت‌های مرتبط با اسینتوباکتر بومانی است که یکی از مهم‌ترین دلایل آن انتخاب و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های نامناسب جهت درمان عفونت‌های باکتریایی است. درمان‌های نامناسب آنتی‌بیوتیکی به طور قابل توجهی منجر به افزایش هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی بیماران در مراکز بهداشتی درمانی می‌شود و نیز استفاده نامناسب از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث کاهش عمر مفید آن‌ها شده و نگرانی اصلی در مورد کمبود کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید را بیشتر می‌کند (۲۶). آزمایش‌های سریع و دقیق تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها می‌تواند به میزان قابل توجهی مرگ‌ومیر و هزینه‌های مالی مرتبط را کاهش دهد. علاوه بر این، ضرورت تجویز سریع یک درمان تجربی اولیه ضد میکروبی زمانی که پزشک در انتظار کسب نتایج تست حساسیت با روش‌های استاندارد زمان‌بر است که اغلب منجر به درمان‌های نامناسب می‌شود بسیار اهمیت دارد.

در این تحقیق با روش فلوسایتومتری و با استفاده از رنگ رودامین ۱۲۳ از طریق پارامترهای پراکندگی رو به جلو (Fc)، پراکندگی کناری (SS)، در غلظت‌های ۲، ۴ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک مروپنم میزان سلول‌های کشته شده به ترتیب ۱۹۶/۹ درصد، ۱/۴۴ درصد و ۰/۵۹ درصد بود. در غلظت‌های ۱۲۸، ۶۴ و ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک پپراسیلین تازوباکتام میزان

دهد. درحالیکه کارکنان طی روندهای تست حساسیت مراحل مختلفی را جهت آماده‌سازی روش به کار می‌برند. از سوی دیگر، این روش اطلاعات متفاوتی از تعداد زیادی از باکتری‌ها با تلاش کمتر و زمان کمتری به دست می‌آورد. فلوسایتومتری قادر است جمعیت‌های متنوع میکروبی در یک سوسپانسیون را آنالیز کند و تنوع میکروبی را نشان دهد. این در حالی است که با روش‌های بر پایه کشت و MIC جمعیت‌های مختلف میکروبی در کشت قابل تمایز نیستند. کوتاه کردن زمان نتایج آنتی‌بیوگرام بیماران به ویژه بیماران بستری در بخش‌های ویژه با کوتاه کردن زمان روش‌های سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیک جهت بهبود بیماران اهمیت ویژه‌ای دارد و مسیری رو به جلو برای تأثیر بیشتر و درمان به‌موقع این بیماران به وجود می‌آورد.

### نتیجه‌گیری

نتایج تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش فلوسایتومتری، تنها ۴ ساعت پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی حاصل کشت شبانه‌روزی کلنی‌های باکتریایی به دست آمد و نشان داد که بیش از ۹۸ درصد از سلول‌های باکتریایی پس از تأثیر در غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم و پیپراسیلین همچنان زنده باقی می‌مانند؛ این، با نتایج حاصل از روش انتشار در دیسک و روش MIC برای تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اسینتوباکتر بومانی* هم‌خوانی داشت. این امر، اهمیت استفاده از فلوسایتومتر را به عنوان روشی سریع و حساس جهت تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های باکتریایی نشان می‌دهد. رنگ رودامین ۱۲۳ به عنوان یک رنگ کاتیونی برای بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش فلوسایتومتر استفاده شد. با این حال، لزوم استفاده از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مانند جنتامیسین که در این مطالعه مقاومت کمتری نسبت به مروپنم و پیپراسیلین تازوباکتام نشان داده و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی تعداد سویه‌های باکتریایی بیشتر به روش فلوسایتومتری در مطالعات آینده پیشنهاد می‌شود. از طرفی، زمان گرمخانه‌گذاری جدایه‌ها پس از تعیین منحنی رشد لگاریتمی باکتری مورد مطالعه امری است که باید به آن توجه شود. امروزه فلوسایتومتری برای تحقیقات و بیوتکنولوژی نه فقط مطلوب است بلکه ممکن است به‌زودی راه خود را به آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی بالینی باز کند و در طیف وسیع‌تری از مطالعات میکروبیولوژی به کار گرفته شود.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از جناب آقای امید حسینی کارشناس آزمایشگاه جامع تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی که ما را در اجرای این پژوهش یاری کردند، تقدیر و تشکر می‌شود.

در دیسک، میکرودایلوشن براث و فلوسایتومتری و بررسی معیار توافق بین روش‌ها نشان داد که ۱۰۰٪ نتایج مطابقت دارد.

Soejima و همکاران توانستند از ترکیب تیمار اتیدیوم مونو آزید (ethidium monoazide (EMA)) با FCM به عنوان روشی سریع برای تمایز بین سلول‌های زنده و آسیب‌دیده باکتری لیستریا مونوسایتوتوز تحت تأثیر آنتی‌بیوتیک استفاده کنند. این روش، بسیار سریع‌تر از سایر روش‌های رایج در دسترس که نیاز به صرف زمان طولانی برای انجام مراحل مختلف کشت دارد انجام شد (۲۹). طی مطالعه Saint-Ruf و همکاران، حساسیت ایزوله‌های بالینی باکتری‌های گرم منفی اشریشیا کلی و سودوموناس اثرورینوزا را با سه کلاس از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون‌ها بررسی کردند. آنها علاوه بر فلوروکروم الکسا فلور هیدرازید ۶۳۳ یا AFH، از TO-PRO<sup>3</sup>-3 استفاده کردند. این رنگ‌ها وارد غشاهای آسیب‌دیده سلول‌ها شده و به DNA متصل می‌شوند. در آن مطالعه روش فلوسایتومتری روشی برای اثبات تشخیص سریع و قابل اعتماد حساسیت آنتی‌بیوتیک مناسب تشخیص داده شد (۳۰). Huang و همکاران، واکنش باکتری‌ها را با در معرض قرار گرفتن در مقابل آنتی‌بیوتیک توسط فلوسایتومتر بررسی کردند. دو سویه حساس (اشریشیا کلی و سودوموناس اثرورینوزا) و یک سویه مقاوم چنددارویی (ایزوله بالینی اشریشیا کلی) با رنگ IR786 رنگ‌آمیزی شدند و با آنتی‌بیوتیک‌های باکتریواستاتیک برای شناسایی تغییرات وارد شده در محدوده حداقل غلظت مهاری بررسی شدند. آسیب ناشی از آنتی‌بیوتیک به وسیله جریان سایتومتری بعد از ۱ ساعت انکوباسیون از طریق پراکندگی رو به جلو (Forward Scatter) (Fc)، پراکندگی کناری (SS) (Side Scatter) و کانال‌های فلورسنس دیده شد. اختلاف آشکاری بین اطلاعات جریان سایتومتری از باکتری تیمارنشده با آنتی‌بیوتیک و باکتری‌های تیمارنشده با آنتی‌بیوتیک مشاهده شده بود (۳۱). Huang و همکاران مجدداً در سال ۲۰۱۸ توانستند الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی پاتوژن‌های مقاوم چندگانه دارویی جداشده از خون مانند اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و اسینتوباکتر نوسوکومیالیس را طی ۸ ساعت از کشت اولیه خون بیماران با روش فلوسایتومتری تعیین کنند و گزارش دادند که با کاهش چشمگیر در زمان تشخیص و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توان نتایج معالجه درمانی بیماران را به طور چشمگیری بهبود بخشید و میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی را کاهش داد (۳۲).

فلوسایتومتری هزینه‌های بالایی ندارد، و سایتومتر می‌تواند بسیاری از مراحل پیچیدگی را به صورت اتوماتیک انجام

## تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

## References

1. Veal DA, Deere D, Ferrari B, Piper J, Attfield PV. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of Immunological Methods*. 2000; 243:220-191. [DOI:10.1016/S0022-1759(00)00234-9]
2. Nuding S, Zabel LT. Detection, identification, and susceptibility testing of bacteria by flow cytometry. *Journal of Bacteriology & Parasitology*. 2013; S5-005. Doi: 10(4172):2155-9597 [DOI:10.4172/2155-9597.S5-005]
3. Kansanaho H, Isonen-Sjölund N, Pietilä K, Airaksinen M, Isonen T. Patient counselling profile in a Finnish pharmacy. *Patient Education and Counseling*. 2002; 47(1):77-82. [DOI:10.1016/S0738-3991(01)00180-X]
4. Huang TH, Ning X, Wang X, Murthy N, Tzeng YL, Dickson RM. Rapid cytometric antibiotic susceptibility testing utilizing adaptive multidimensional statistical metrics. *Analytical chemistry*. 2015; 87(3):1941-9. [DOI:10.1021/ac504241x] [PMID] [PMCID]
5. Wu L, Wang S, Song Y, Wang X, Yan X. Applications and challenges for single-bacteria analysis by flow cytometry. *Science China Chemistry*. 2016; 59(1):30-9. [DOI:10.1007/s11426-015-5518-3]
6. Fraser D, Kaern M. A chance at survival: gene expression noise and phenotypic diversification strategies. *Molecular Microbiology*. 2009; 71(6):1333-40. [DOI:10.1111/j.1365-2958.2009.06605.x] [PMID]
7. Rainey PB, Beaumont HJ, Ferguson GC, Gallie J, Kost C, Libby E, et al. The evolutionary emergence of stochastic phenotype switching in bacteria. 2011. 2011; 10(Suppl 1):S14. [DOI:10.1186/1475-2859-10-S1-S14] [PMID] [PMCID]
8. Paau AS, Cowles JR, Oro J. Flow-microfluorometric analysis of *Escherichia coli*, *Rhizobium meliloti*, and *Rhizobium japonicum* at different stages of the growth cycle. *Canadian journal of microbiology*. 1977; 23(9):1165-9. [DOI:10.1139/m77-175] [PMID]
9. Hutter KJ, Eipel H. Microbial determinations by flow cytometry. *Microbiology*. 1979; 113(2):369-75. [DOI:10.1099/00221287-113-2-369] [PMID]
10. Haugland RP. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Eugene: Molecular Probes Inc.; 1996.
11. Shapiro HM. Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques. *Journal of Microbiological Methods*. 2000; 42(1):3-16. [DOI:10.1016/S0167-7012(00)00167-6]
12. Sack U, Tárnok A, Rothe G. Cellular diagnostics: basic principles, methods and clinical applications of flow cytometry. Basel: Karger Medical and Scientific Publishers; 2009. [DOI:10.1159/isbn.978-3-8055-8556-9]
13. Suller M, Stark J, Lloyd D. A flow cytometric study of antibiotic-induced damage and evaluation as a rapid antibiotic susceptibility test for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1997; 40(1):77-83. [DOI:10.1093/jac/40.1.77] [PMID]
14. Mason D, Allman R, Stark J, Lloyd D. Rapid estimation of bacterial antibiotic susceptibility with flow cytometry. *Journal of Microscopy*. 1994; 176(1):8-16. [DOI:10.1111/j.1365-2818.1994.tb03494.x] [PMID]
15. Suller M, Lloyd D. Fluorescence monitoring of antibiotic-induced bacterial damage using flow cytometry. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 1999; 35(3):235-41. [DOI:10.1002/(SICI)1097-0320(19990301)35:33.0.CO;2-0]
16. Gauthier C, Pierre STY, Villemure R. Rapid antimicrobial susceptibility testing of urinary tract isolates and samples by flow cytometry. *Journal of Medical Microbiology*. 2002; 51:192-200. [DOI:10.1099/0022-1317-51-3-192] [PMID]
17. Zilberberg MD, Nathanson BH, Sulham K, Fan W, Shorr AF. Multidrug resistance, inappropriate empiric therapy, and hospital mortality in *Acinetobacter baumannii* pneumonia and sepsis. *Critical Care*. 2016; 20(1):221. [DOI:10.1186/s13054-016-1392-4] [PMID] [PMCID]

18. Visca P, Seifert H, Towner KJ. Acinetobacter infection-an emerging threat to human health. *IUBMB life*. 2011; 63(12):1048-54. [DOI:10.1002/iub.600] [PMID]
19. McConnell MJ, Actis L, Pachón J. Acinetobacter baumannii: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiology Review*. 2013; 37(2):130-55. [DOI:10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x] [PMID]
20. Falagas ME, Karveli EA. The changing global epidemiology of Acinetobacter baumannii infections: a development with major public health implications. *Clinical Microbiology and Infection*. 2007; 13(2):117-9. [DOI:10.1111/j.1469-0691.2006.01596.x] [PMID]
21. Falagas ME, Bliziotis IA, Siempos II. Attributable mortality of Acinetobacter baumannii infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Critical Care*. 2006; 10(2):R48. [DOI:10.1186/cc4869] [PMID] [PMCID]
22. Karbasizade V, Heidari L. Antimicrobial resistance of Acinetobacter baumannii isolated from Intensive Care Units of Isfahan hospitals, Iran. *Journal of Isfahan Medical School*. 2012; 30(191).
23. Ardebili A, Lari AR, Talebi M. Correlation of ciprofloxacin resistance with the AdeABC efflux system in Acinetobacter baumannii clinical isolates. *Annals of Laboratory Medicine*. 2014; 34(6):433-8. [DOI:10.3343/alm.2014.34.6.433] [PMID] [PMCID]
24. Moradi J, Hashemi FB, Bahador A. Antibiotic resistance of Acinetobacter baumannii in Iran: a systemic review of the published literature. *Osong Public Health and Research Perspectives*. 2015; 6(2):79-86. [DOI:10.1016/j.phrp.2014.12.006] [PMID] [PMCID]
25. Ghasemian R, Ahanjan M, Fatehi E, Shokri M. Prevalence and antibiotic resistance pattern of Acinetobacter isolated from patients admitted in ICUs in Mazandaran, Northern Iran. *Global Journal of Health Science*. 2016; 11(8):112-9. [DOI:10.5539/gjhs.v8n11p112]
26. Heinemann JA, Ankenbauer RG, Amábile-Cuevas CF. Do antibiotics maintain antibiotic resistance? *Drug Discovery Today*. 2000; 5(5):195-204. [DOI:10.1016/S1359-6446(00)01483-5]
27. Comas J, Vives-Rego J. Assessment of the effects of gramicidin, formaldehyde, and surfactants on Escherichia coli by flow cytometry using nucleic acid and membrane potential dyes. *Cytometry*. 1997; 29:58-64. [DOI:10.1002/(SICI)1097-0320(19970901)29:13.0.CO;2-9]
28. Walberg M, Steent HB. Flow cytometric monitoring of bacterial susceptibility to antibiotics. *Methods in Cell Biology*. 2001; 64:553-66. [DOI:10.1016/S0091-679X(01)64029-9]
29. Soejima T, Minami JI, Iwatsuki K. The exclusive use of flow cytometry to evaluate the antibiotic-susceptibility. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2012; 1820(12):1980-6. [DOI:10.1016/j.bbagen.2012.09.003] [PMID]
30. Saint-Ruf C, Crussard S, Franceschi C, Orensa S, Ouattara J, Ramjeet M, et al. Antibiotic susceptibility testing of the gram-negative bacteria based on flow cytometry. *Frontiers in Microbiology*. 2016; 7:1121. [DOI:10.3389/fmicb.2016.01121] [PMID] [PMCID]
31. Huang TH, Ning X, Wang X, Murthy N, Tzeng YL, Dickson RM. Rapid cytometric antibiotic susceptibility testing utilizing adaptive multidimensional statistical metrics. *Analytical Chemistry*. 2015; 87(3):1941-9. [DOI:10.1021/ac504241x] [PMID] [PMCID]
32. Huang TH, Tzeng Y, Land Dickson R. FAST: Rapid Determinations of Antibiotic Susceptibility Phenotypes using Label-Free. *Cytometry Cytometry A*. 2018; 93(6):63948. [DOI:10.1002/cyto.a.23370] [PMID] [PMCID]