اثر ضد بیوفیلم پپتید ضد میکروبی ملیتین برسویه‌های آسینتوباکتربومانی جدا شده از بیماران دچار عفونت سوختگی

فرزانه محقق[۱]، فاطمه پاشایی[۲]،کامران پوشنگ باقری[۲]*

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد نائین، دانشگاه آزاد اسلامی، نائین، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، انستیتو پاستور ایران

***نشانی برای مکاتبه:** تهران،انستیتوپاستورایران،مرکزتحقیقات بیوتکنولوژی،گروه بیوتکنولوژی،آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی،تلفن ونمابر:۶۶۴۸۰۷۸۰،کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، k_bagheri@pasteur.ac.ir

دریافت مقاله : مرداد نود و شش پذیرش برای چاپ: مهر نود و شش

چکیده

سابقه و هدف: *:آسینتوباکتر بومانی یک عامل بیماریزای خطرناک در ایجاد عفونت سوختگی به شمار می رود. امروزه تعداد آسینتوباکتربومانی‌های مقاوم به آنتی بیوتیک ها رو به افزایش بوده و پیشنهاد می شود که برای درمان این عفونت ها از پپتیدهای ضد میکروبی استفاده شود. بنابراین هدف از این تحقیق تعیین اثر پپتید ملیتین بر تخریب بیوفیلم سویه های آسینتوباکتر بومانی و همچنین اثر کشندگی آن تعیین گردید.*

روش کار: *ملیتین با تکنیک کروماتوگرافی فاز معکوس از زهر زنبور تخلیص گردید. ابتدا میزان تولید بیوفیلم ۲۵ سویه به روش اسپکتروفوتومتری بررسی گردید. سپس اثر تخریبی ملیتین بر بیوفیلم به روش اسپکتروفوتومتری و اثر کشندگی آن بر باکتری های داخل بیوفیلم، به روش کشت بررسی گردیدند.*

یافته ها: *تمام سویه ها تولید کننده بیوفیلم هستند و میانگین تولید، مقدار ۰,۹۸ برآورد گردید. در تست تخریب ملیتین، میانگین OD از حدود یک به ۰,۱۵ کاهش پیدا کرد. نتایج کشت نشان داد که باکتری های داخل بیوفیلم در مقادیر مختلف ملیتین از بین رفته بودند.*

نتیجه گیری: *میزان تولید بیوفیلم در سویه ها با همدیگر متفاوت بود که این موضوع نشان می دهد که میزان بیان ژن های تولیدکننده بیوفیلم در بین سویه ها متفاوت است. نتایج تست تخریب بیوفیلم نشان داد که با افزایش مقدار پپتید تخریب بیشتری صورت می‌گیرد که می تواند به دلیل ایجاد منفذ در سطح بیوفیلم باشد. نتایج تست کشندگی پپتید نشان داد که ملیتین می‌تواند از بیوفیلم عبور کرده و آسینتوباکتر ها را از بین ببرد.*

واژگان کلیدی: آسینتوباکتر بومانی، ملیتین، تولید بیوفیلم، تخریب بیوفیلم، اسپکتروفوتومتری، کشت

مقدمه

آسینتوباکتر بومانی یک پاتوژن گرم منفی فرصت‌طلب، هوازی،کوکوباسیل، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، غیرتخمیری و فاقد اسپور می باشد و توانایی رشد در pH مختلف را دارد. بر اساس طبقه بندی های جدید اسینتوباکتر در خانواده ی Moraxellaceae قرار گرفته است(۴-۱). مطالعات مختلف نشان میدهند که عمده ترین گونه اسینتویاکتر جدا شده از نمونه های بالینی اسینتوباکتربومانی است. در طی دهه های گذشته اسینتوباکتر بومانی به عنوان یک پاتوژن بیمارستانی ظهور پیدا کرد که قادر است به سرعت خود را با محیط بیمارستان تطابق بدهد(۶ ،۵).در سه دهه گذشته اسینتوباکتر بومانی با آنتیبیوتیکهای رایج به طور موثر قابل درمان بود. اما متاسفانه در سالهای اخیر این باکتری به علت مقاومتی که به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها داشت مورد توجه قرار گرفته است. بطوریکه امروزه تقریبا به همهی کلاسهای آنتی بیوتیکی شامل فلوروکئینولونها، اغلب آمینوگلیکوزیدها، کرباپنم ها، سفالوسپورینها، پنی سیلین های وسیع الطیف و تتراسایکلین مقاوم است(۷) که دلیل آن قابلیت پذیرش ژنتیکی بیشترآسینتوباکتر بومانی نسبت به سایر گونه های آسینتوباکتر است. با مشاهده مطالعات متعددی که الگوهای مختلف حساسیت آنتی بیوتیکی را بین گونه های اسینتوباکتر بررسی نموده اند، میتوان به این نتیجه رسید که شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی اسینتوباکتربومانی در قیاس با بقیه گونه های اسینتوباکتر بالاتر

می‌باشد. در مطالعه ای از آلمان در سال ۱۹۹۰ ، ایمی پنم فعالیت قابل قبولی را بر روی اسینتو باکتر بومانی داشت به طوری که از ۱۸۰ نمونه، همه به این آنتی بیوتیک حساس بودند. همچنین آموکسی سیلین- کلاونیک اسید دارای فعالیت متوسط بود و آمپی سیلین، سفالوسپورین ها و پنی سیلینهای وسیع الطیف اثر ضعیفی را نشان دادند. در مطالعه دیگری که در سال ۱۹۹۱ در آلمان انجام گرفت از بین نمونه های اسینتو باکتر مربوط به بخشICU، بیش از ۹۰٪ به ایمی پنم و سفتازیدیم حساس بودند(۵). اسینتو باکتر هایی که بین سال های ۱۹۹۴ تا ۱۹۹۵ از بخش آی‌سی‌یو پنج کشور اروپایی جدا گردید حساسیت به سفتازیدیم را به صورت ۸۲٪ در بلژیک،۳۰٪ در فرانسه، ۱۹٪ در پرتغال، ۲۴٪ در اسپانیا و ۱۰۰٪ در سوئد نشان دادند. همچنین حساسیت به ایمی پنم در این کشورها به صورت ۸۸٪ بلژیک، ۹۱٪ فرانسه، ۹۵٪ پرتغال و ۹۱٪ در سوئد بود. این در حالی است که امروزه حساسیت اسینتوباکتر بومانی به آنتی بیوتیک های فوق الذکر بشدت کاهش یافته است(۹ ،۸).

مراحل تشکیل بیوفیلم در ۵ مرحله ایجاد می‌شود. مرحله نخست اتصال اولیه است که در عرض چند ثانیه و توسط نیروهای واندروالس صورت میگیرد و برگشت پذیر است. پیلی و مولکول های چسبنده در این اتصال نقش دارند. مرحله دوم اتصال غیر قابل برگشتی است که حرکت سلول ها کم شده و باکتری ها تجمع می یابند و اگزوپلی ساکارید خارجی تولید میشود. مرحله سوم با افزایش ضخامت و با اتصال و تجمع باکتری ها همراه است. بیوفیلم با افزایش ضخامت به بیش از ۱۰ میلی متر تشکیل میگردد. در مرحله آخر، تولید سلول های دختر و جدا شدن سلول ها اتفاق می افتد. بعضی از مقالات این مرحله را حرکت موقت می نامند(۱۰). با تشکیل بیوفیلم، کلونیزاسیون راحتتر صورت میگیرد و در برابر جریان خون و ادرار پابرجا مانده و باکتری های بیوفیلم از دسترس سیستم ایمنی میزبان مانند فاگوسیتوز در امان می مانند و همچنین انتقال ژن راحت تر صورت می گیرد (۱۱،۱۰). زمانیکه باکتری ها در فرم بیوفیلم هستند، ۱۰ تا ۱۰۰۰ برابر مقاومت بیشتری نسبت به آنتی بیوتیکها نشان می دهند(۱۲). لذا با توجه به مشکلات مطرح شده، این مطالعه جهت ارزیابی اثر آنتی باکتریال و تخریب بیوفیلم توسط پپتید ملیتین بر سویه‌های آسینتوباکتربومانی جدا شده از بیماران دچار عفونت سوختگی هدف گزاری گردید.

روش کار

زهر از زنبورهای منطقه شهرکرد، توسط شرکت فروشنده به روش الکترو شوک تهیه شد. نمونه های آسینتو باکتر بومانی در بیمارستان شهید مطهری از بیماران دچار عفونت سوختگی در یک دوره ۸ ماهه از دی۱۳۹۳ تا مرداد ۱۳۹۴ جمع آوری شد. تعداد نمونه های مورد بررسی ۲۵ عدد است.باکتری ها بعد از کشت در محیط stock حاوی ۲۰٪ گلیسرول و در داخل ۲۰- نگه داشته شدند. با انجام تست های اکسیداز، سیترات، تریپل شوگر آیرون (TSI) و OF جنس و گونه باکتری ها تعیین شد.

برای آماده سازی زهر ابتدا ۲۰ میلی گرم از آن را وزن کرده و در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل شده و سپس در g۱۲۴۷۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. برای تخلیص ملیتین از زهر زنبور از کروماتوگرافی فاز معکوس و ستون C۱۸ استفاده شد. محلول های مورد استفاده در این آزمایش شامل محلول B (استونیتریل خالص به همراه آب TFA ۰/۰۵ ٪ (تری فلورو استیک اسید = TFA) ومحلول D (آب دیونیزه به همراه آب TFA ۰/۰۵) بود. برای لیوفیلیزه کردن نمونه ها ابتدا ملیتین تخلیص شده را در یک بشر ریخته و جهت خشک کردن ، به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه فریز درایر قرار گرفت.

برای تعیین غلظت ملیتین از روش BCA استفاده و بعد OD آن در طول موج ۵۶۲ نانومتر خوانده شده و غلظت نهایی محاسبه گردید.

جهت تهیه نیم مک فارلند، باکتری را در محیط TSB کشت داده و بعد از سانتریفیوژ رسوب را در یک میلی لیتر TSB سوسپانسیونه کرده و سپس مجددا سانتریفیوژ کرده و از رسوب، سوسپانسیون تمیز تهیه گردید.

برای تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) ملیتین، مقدار µg ۱۶ در حجم µl ۲۰۰ به چاهک اول اضافه شده و مقادیر بعدی بصورت رقیق سازی سریالی با ضریب ۱/۲ تهیه شد. پس از رقت سازی، به هر چاهک ۱۰۰میکرولیتر باکتری با تعداد ۵×۱۰^{۵} عدد اضافه گردید و میکروپلیت به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. آخرین چاهک شفاف به عنوان MIC تعیین گردید.

جهت تعیین حداقل کشندگی (MBC) ملیتین از چاهک های شفاف ۱۰ میکرو لیتر برداشته و در محیط کشت مولر هینتون اگار کشت داده شد و به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت، در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از آن تعداد کلنی های رشد کرده در محیط، شمارش گردید.

جهت بررسی تولید بیوفیلم در سویه های مورد بررسی، در پلیت ۹۶ خانه ای برای هر باکتری دو چاهک در نظر گرفته شد. چاهک اول مربوط به TSB با گلوکز ۱٪ و بدون باکتری (بعنوان کنترل-۲۰۰لاندا) و خانه دوم TSB باگلوکز ۱٪ (۱۰۰لاندا) و سوسپانسیون باکتری (۱۰۰لاندا) می‌باشد. تعداد ۱۰ به توان ۷ باکتری از هر سویه به میکروپلیت ۹۶ خانه ای اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکر دار قرار گرفت. سپس محلول رویی با سمپلر از هر دو چاهک برداشته و با سرم فیزیولوژی سه مرتبه چاهک ها شسته شدند. سپس به هر چاهک ۲۰۰ لاندا متانول۱۰۰٪ به مدت ۱۵ دقیقه اضافه گردید. سپس محلول داخل چاهک دور ریخته شده و به ان ۲۰۰ لاندا رنگ کریستال ویوله اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه اینکوبه شد. سپس رنگ را با سمپلر خارج کرده و چندین بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد

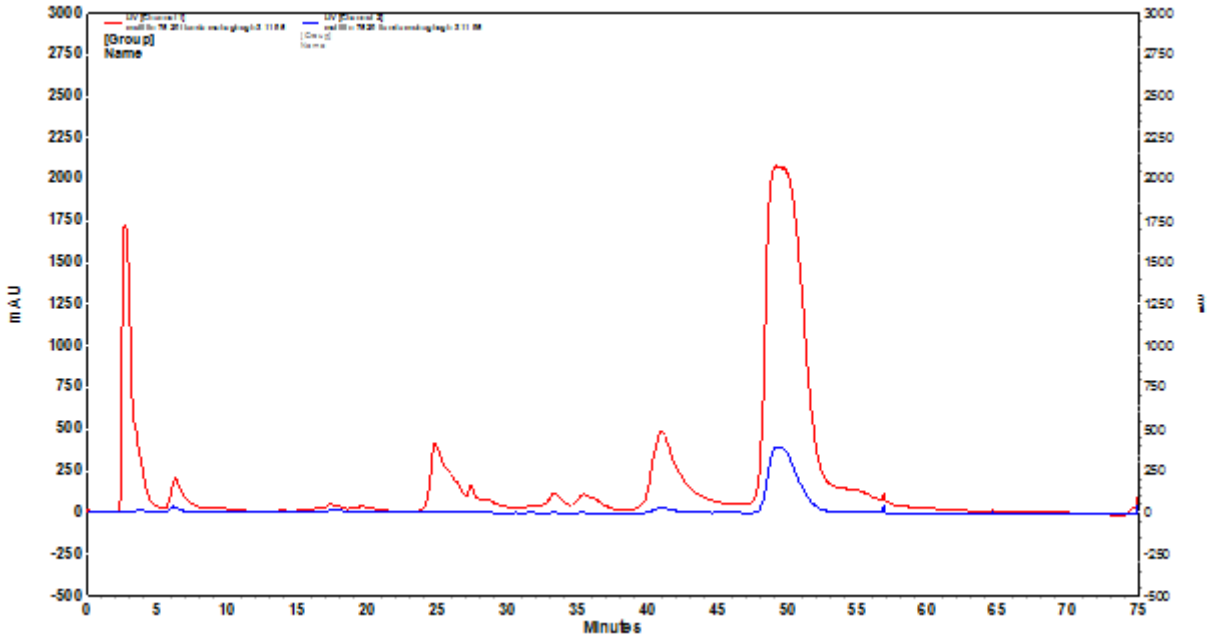
تا رنگ اضافه شسته شود. بعد از خشک شدن چاهک ها، ۲۰۰ لاندا اتانول ۹۶٪به همه ی چاهک ها اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. در نهایت OD پلیت در طول موج ۵۹۵ نانومتر با اسپکتوفتومتر ثبت گردید.

جهت بررسی اثر تخریبی ملیتین بر بیوفیلم سویه ها، ابتدا طبق روش فوق بیوفیلم سویه ها در چاهک های میکروپلیت تشکیل گردید. سپس مقادیر مختلف ملیتین به روش رقت سازی سریال از 50 تا 0/39 میکروگرم تهیه گردید و به چاهک های شسته شده اضافه گردید. بعد از طی زمان ۶ ساعت، طبق روش فوق چاهک ها با آرامی شسته شده و رنگ آمیزی گردید. سپس OD نمونه ها قرائت گردید. کاهش مقدار OD در چاهک ها نشاندهنده تخریب بیوفیلم تلقی گردید. به منظور بررسی اثر کشندگی ملیتین بر باکتری های داخل بیوفیلم، به روش فوق ملیتین تهیه شده و به بیوفیلم تشکیل شده اضافه گردید.

بعد از طی زمان ۶ ساعت، کف چاهک ها با یک سرسمپلر خراشیده شده و حجم ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس بعد از زمان ۲۴ ساعت، تعداد کلنی های باکتری ها شمارش گردید. محیط کشت TSB حاوی قند گلوکز و TSB حاوی قند و باکتری به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت جهت کنترل کیفی نتایج مورد استفاده قرار گرفت.

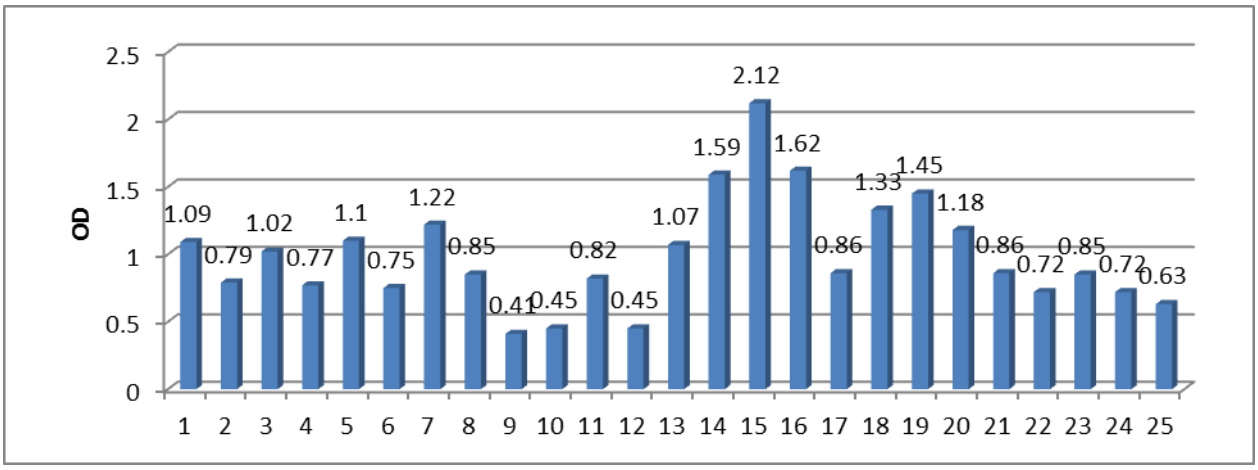
یافته ها

در کروماتوگرام زهر زنبور حدود ۲۰ پیک قابل تشخیص بود. بیشترین سطح زیر منحنی بین فراکشن های موجود، مربوط به ملیتین بود. در حدود دقیقه ۴۹ تا ۵۳ (معادل با ۴ دقیقه) ملیتین از ستون C_{18} خارج شده است (عکس ۱).



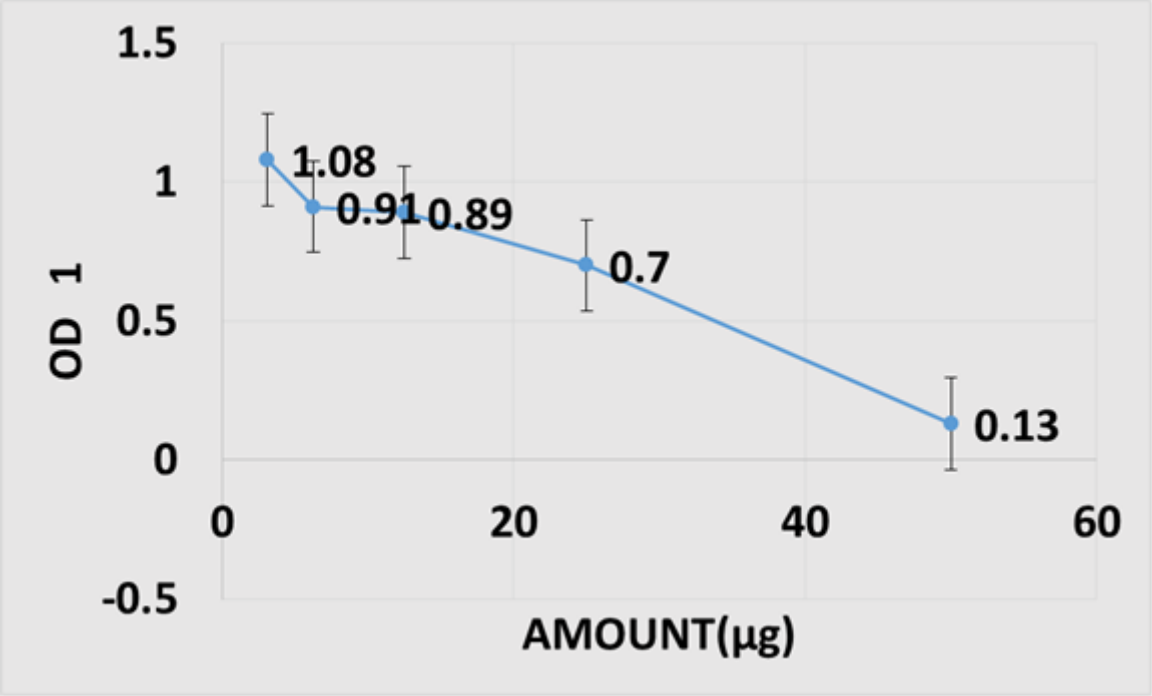
عکس ۱. نمودار کروماتوگرام زهر زنبور. زمان جداسازی ملیتین از حدود ۴۹ الی ۵۳ دقیقه برآورد گردید.

طیف اثر ملیتین جهت مهار رشد و کشتن سویه ها به ترتیب ۰/۲۵ الی ۱ و ۰/۲۵ الی ۴ میکروگرم بوده است. نسبت MIC/MBC نیز بین ۱/۴ الی ۱ متغیر بود. تمام سویه ها قادر به تولید بیوفیلم بودند اما مقادیر در سویه ها متفاوت بود. میانگین کل OD در تمام سویه ها برابر با ۰/۹۸ با انحراف از معیار ۰/۲ بود (نمودار ۱).

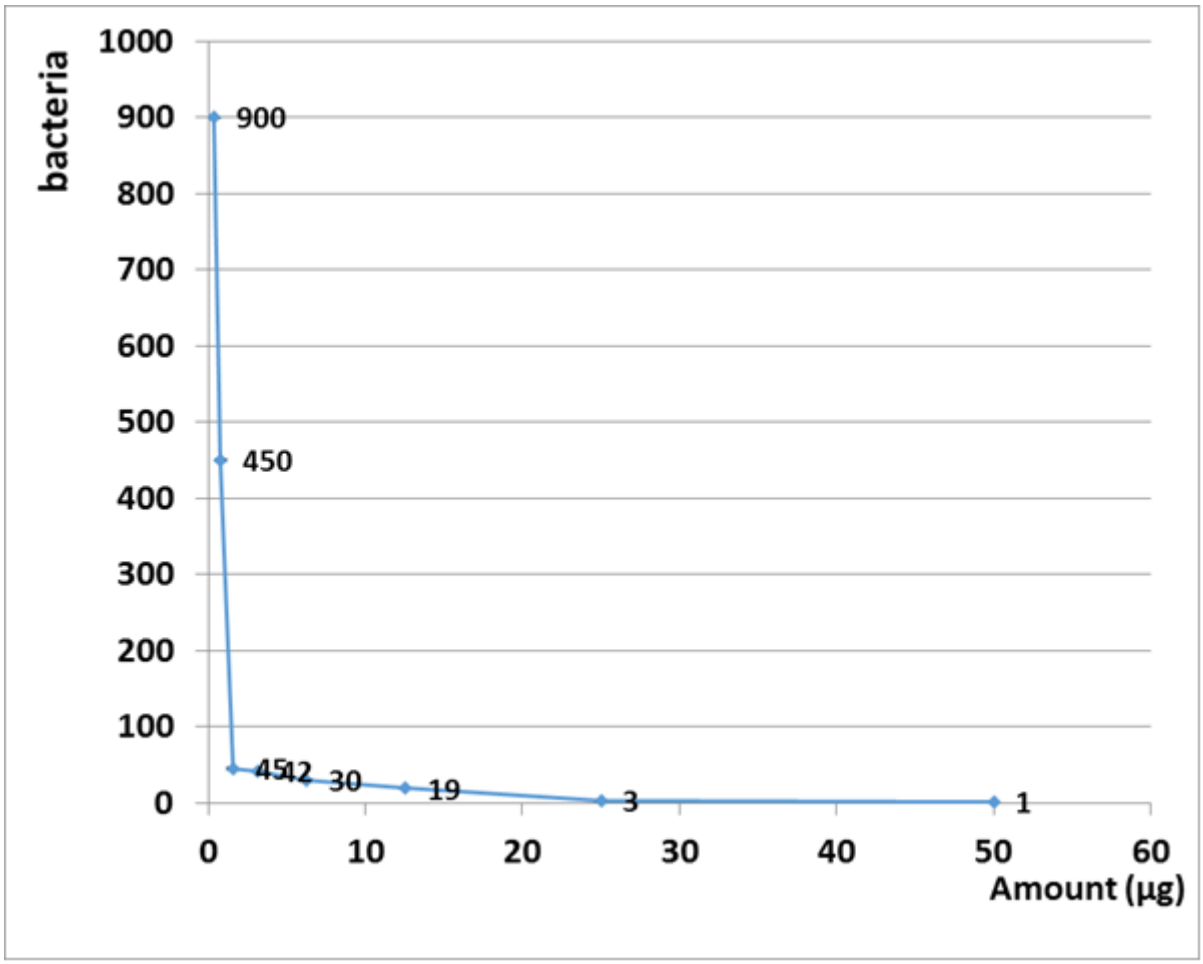


نمودار۱. نتایج بررسی تولید بیوفیلم توسط سویه های آسینتوباکتر بومانی

با افزایش مقدار ملیتین میزان OD کاهش یافت که این نتیجه نشان دهنده تخریب بیوفیلم باکتری است. در نمودار شماره ۲ یک نمونه از نتایج بدست آمده نشان داده شده است. تست ها به صورت سه بار تکرار انجام شد.نتایج تست بررسی اثر کشندگی ملیتین بر باکتری های داخل بیوفیلم با افزایش مقدار ملیتین تعداد باکتری ها کاهش می یابد. نتایج یکی از سویه ها به عنوان نمونه در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است.



نمودار۲. نتایج بررسی تخریب بیوفیلم توسط ملیتین به روش اسپکتروفوتومتری. با افزایش مقدار ملیتین میزان OD کاهش یافت که این نتیجه نشان دهنده تخریب بیوفیلم باکتری است. تست ها به صورت سه بار تکرار انجام شد.



نمودار۳. نتایج تست بررسی اثر کشندگی ملیتین بر باکتری های داخل بیوفیلم. نتایج تست بررسی اثر کشندگی ملیتین بر باکتری های داخل بیوفیلم نشان داد که با افزایش مقدار ملیتین تعداد باکتری ها کاهش یافته و در نهایت در ۵۰ میکروگرم صفر می شود

بحث

عفونت های ناشی از *آسینتوباکتر بومانی به دلیل* مقاومت های آنتی بیوتیکی همیشه مورد توجه قرار گرفته اند.*آسینتوباکتر بومانی* یکی از شایعترین علت عفونت های سوختگی بوده و همچنین می تواند عامل بیماری در ریه به ویژه پنومونی، عفونت دستگاه ادراری، کلیه ها، پوست، چشم، خون و... باشد. این باکتری همچنین از تجهیزات و وسایل پزشکی مثل ساکشن ها، ونتیلاتورها و کاتترهای عروقی یا سوندهای ادراری جداسازی شده است. این باکتری یک پاتوژن بیمارستانی فرصت طلب است که در افراد دچار نقص ایمنی ایجاد بیماری می کند(۱۳).*آسینتوباکتر* به اکثر داروها مقاوم می باشند که از جمله این داروها می توان به کاربانم ها، سفالوسپورین ها ،بتا لاکتام ها، فلوروکینولون ها و آمینوگلیکوزید ها اشاره کرد. این باکتری از طریق مکانیسم های مختلف نسبت به آنتی بیوتیک ها مقاوم می شود. لیپوپلی ساکارید غشاء خارجی *آسینتوباکتر* جذب آنتی بیوتیک ها را به تأخیر می اندازد که این مسئله به دلیل نفوذپذیری کم غشاء خارجی است که باعث می شود مولکول های هیدروفیل کوچک نتوانند به خوبی از غشاء عبور کنند(۱۴).

آسینتوباکتر بومانی معمولاً با یک دارو درمان نمی شود، زیرا باکتری به سرعت به آن مقاوم شده و میزان موفقیت درمان پایین است. این امر به خاطر نفوذپذیری کم غشاء خارجی سلول باکتری به آنتی بیوتیک ها است. این باکتری علاوه بر مقاومت ذاتی، به وسیله جهش کروموزومی یا بوسیله انتقال ژن، مقاومت پیدا می کند که این دلایل از عوامل مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری هستند. برخی از مطالعات اخیر نشان داده اند که مقاومت فنوتیپی مربوط به تشکیل بیوفیلم نیز ممکن است در مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری به درمان مهم باشد(۱۵). عفونت های ناشی از *آسینتوباکتر بومانی به دلیل* مقاومت های آنتی بیوتیکی همیشه مورد توجه قرار گرفته اند. با توجه به بررسی متون به عمل آمده باکتریهای موجود در بیوفیلم نسبت به آنتی بیوتیک‌ها مقاوم هستند(۱۵).

درمان بیوفیلم هنوز یکی از معضلات مهم بشر می باشد. بیشترین مرگ و میر ناشی از عفونت‌های سوختگی آسینتوباکتر بومانی مربوط به بیوفیلم‌های ایجاد شده ناشی از باکتری‌ها می باشد. یکی از راه های درمانی پیشنهاد استفاده از پپتید ملیتین می باشد.

در آزمایشاتی که طی این تحقیق انجام شد ملیتین به مراتب موثر تر از انتی بیوتیک‌های رایج میباشد و چه بسا با توجه به مقاومت‌های روز افزونی که نسبت به انتی بیوتیک‌های مورد استفاده در حال وقوع است جایگزین بسیار مناسبی بجای انتی بیوتیک‌ها باشد. ملیتین مشکلات اثر سوء جهش‌ها را ندارد و هزینه ان به مراتب نسبت به روش‌های فاژ درمانی مقرون به صرفه تر است. با اجرایی شدن این روش در بیمارستان‌ها چه بسا استفاده نابجا از انتی بیوتیک‌ها اصلاح شود و درمانی موثرتر و کارامدتر اجرا شود.

بررسی نتایج تست MIC و MBC نشان داد که مقدار یک میکروگرم می تواند رشد تمام سویه ها را متوقف کرده و مقدار ۴ میکروگرم می تواند تمام سویه ها را از بین ببرد. نتایج تست تخریب بیوفیلم با پپتید ملیتین نشان داد که با افزایش غلظت پپتید تخریب بیشتری صورت می گیرد و میزان OD از حدود ۱ به میزان حدود ۰/۱۵ کاهش می یابد. این نتایج می تواند بسیار امیدوارکننده باشد. تخریب بیوفیلم تواند به دلیل نفوذ پپتید و ایجاد منافذ بسیار ریز در سطح بیوفیلم باشد. با توجه به اینکه ملیتین دارای بار الکتریکی ۵+ می باشد، لذا می توان حدس زد که بار الکتریکی بیوفیلم *آسینتوباکتر* منفی است که سبب اتصال پپتید به بیوفیلم شده است.نتایج تست از بین رفتن باکتری ها در داخل بیوفیلم نشان داد که پپتید ملیتین نه تنها باعث تخریب بیوفیلم می شود بلکه می تواند از بیوفیلم عبور کرده و *آسینتوباکتر* ها را از بین ببرد. مقایسه اثر ملیتین بر حالت پلانکتونیک در تست MBC و حالت تولید بیوفیلم آسینتوباکتر نشان داد که برای تخریب بیوفیلم و از بین بردن باکتری های داخل آن حداقل به مقدار حدود ۶ برابر بیشتر ملیتین مورد نیاز است.

در عفونت های سطحی بر سطح سوختگی درجه ۳ ، با توجه به این که تمام بافت پوست از بین رفته، لذا سمیت ملیتین مانعی در جهت کاربرد آن در عفونت های سطحی نیست. با توجه به اینکه باکتری‌ها در داخل بیوفیلم متابولیسم بسیار کندی دارند و عملا تکثیر پیدا نمی کنند، بنابراین حتی اکثر آنتی بیوتیک‌های رایج که قابلیت عبور از بیوفیلم را دارند، نمی توانند باعث از بین رفتن کامل باکتری‌ها داخل بیوفیلم شوند، چون تقریبا تمام آنتی بیوتیک‌های موجود هنگامی بر باکتری‌ها اثر می گذارند که باکتری متابولیسم نرمالی داشته و در حال تکثیر باشد. بنابراین با توجه به اینکه پپتید ملیتین بر غشای باکتری‌ها اثر تخریبی گذاشته و آنها را از بین می برد میتوان امیدوار بود که در آینده، ملیتین بعنوان یک آنتی بیوتیک جهت از بین بردن باکتری‌ها در بیوفیلم تشکیل شده در سطح زخم سوختگی بکار رود. با توجه به نتایج بدست آمده میتوان به اهمیت پپتیدهای آنتی ماکروبیال در عبور از بیوفیلم و از بین بردن باکتری‌ها پی برد.

نتیجه گیری

اکثر سویه‌های کلینیکی آسینتنوباکتر بومانی تولید کننده بیوفیلم بودند. ملیتین توانست در مدت کوتاهی در عرض ۶ ساعت بیوفیلم را تخریب کرده و باکتری‌های داخل آنرا نابود کند. با توجه به نتایج به دست آمده می توان دریافت که پپتید ملیتین از آنتی بیوتیک های رایج مورد استفاده بسیار قویتر عمل کرده و امیدواری به کاربرد پپتیدهای آنتی میکروبیال را بیشتر می کند.

REFERENCES

1. Abbo A, Navon-Venezia S, Hammer-Muntz O, Krichali T, Siegman-Igra Y, Carmeli Y. Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Emerg Infect Dis. 2005;11(1):22-9.
2. Afzal-Shah M, Livermore D. Worldwide emergence of carbapenem-resistant Acinetobacter spp. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1998;41(5):576-7.
3. Al-Mously N. Acinetobacter baumannii bloodstream infections in a tertiary hospital: Antimicrobial resistance surveillance. International Journal of Infection Control. 2013;9(2.(
4. Ayraud-Thévenot S, Huart C, Mimoz O, Taouqi M, Laland C, Bousseau A, et al. Control of multi-drug-resistant Acinetobacter baumannii outbreaks in an intensive care unit: feasibility and economic impact of rapid unit closure. Journal of Hospital Infection. 2012;82(4.۲-۲۹۰:)
5. Van Looveren M, Goossens H. Antimicrobial resistance of Acinetobacter spp. in Europe. Clinical microbiology and infection. 2004;10(8):684-704.
6. 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):1.
7. 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.
8. Glupczynski Y, Delmée M, Goossens H, Struelens M. A multicentre survey of antimicrobial resistance in gram-negative isolates from Belgian intensive care units in 1994-1995. Belgian Multicenter ICU Study Group. Acta Clinica Belgica. 1998;53(1):28-38.
9. Hanberger H, Garcia-Rodriguez J-A, Gobernado M, Goossens H, Nilsson LE, Struelens MJ. Antibioticsusceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. Jama. 1999;281(1):67-71.
10. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999;284(5418):1318-22
11. Lee HW, Koh Y, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. Clinical microbiology and infection. 2008;14(1):49-54.
12. Mah T-FC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in microbiology. 2001;9(1):34-9.
13. Dosler S, Mataraci E. In vitro pharmacokinetics of antimicrobial cationic peptides alone and in combination with antibiotics against methicillin resistant Staphylococcus aureus biofilms. Peptides. 2013;49:53-8.
14. Dai T, Huang Y-Y, K Sharma S, T Hashmi J, B Kurup D, R Hamblin M. Topical antimicrobials for burn wound infections. Recent patents on anti-infective drug discovery. 2010;5(2):124-51.
15. Kim B-N, Peleg AY, Lodise TP, Lipman J, Li J, Nation R, et al. Management of meningitis due to antibiotic-resistant Acinetobacter species. The Lancet infectious diseases. 2009;9(4):245-55.