



التیام

شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳۳۲۹۱

eltiam.ivsa@yahoo.com

http://eltiamjournal.ir/

جداسازی و شناسایی باکتری‌های مولد بیوفیلیم در لوله‌های داخل‌نایی حیوانات کوچک

ریحانه سنگ تراش^۱، مهدی عسکری بدوئی^۲، اعظم مختاری^۳، فاطمه افلاکیان^۴، احمدرضا محمدنیا^{۵*}

۱. دانش‌آموخته دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۴. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۵. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

*mohamadnia@um.ac.ir



<https://doi.org/10.30500/eltiamj.13.1.3>

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۱/۲۹، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۰۱



کپی‌رایت © مجله التیام: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان. ناشر: انجمن جراحی دامپزشکی ایران.

چکیده

هدف و زمینه مطالعه: عوامل متعددی در انتقال عفونت‌های ثانویه به بیماران در جراحی نقش دارند. پژوهش‌های اپیدمیولوژیک نقش تجهیزات بیهوشی در ایجاد عفونت جراحی را به خوبی نشان داده است. این مطالعه با هدف بررسی میزان آلودگی باکتریایی لوله‌های داخل‌نایی و دستگاه بیهوشی در حیوانات کوچک انجام شد.

روش کار: در این مطالعه ۱۵ عدد لوله داخل‌نایی و لوله‌ی خرطوم‌ی متصل به دستگاه بیهوشی، دیواره‌ی Canister و سودالایم بررسی شد. نمونه‌های گرفته شده از پنج سانتی‌متر انتهای لوله داخل‌نایی پس از حذف بادکنک انتهایی (قطعه یک)، روی محیط‌های مک‌کانکی آگار، شکلات آگار، مانیتول‌سالت آگار و ستریماید آگار کشت داده شد. پس از کشت باکتریایی، ۵ سانتی‌متر بعدی لوله برش داده شد (قطعه دو) و از هر نمونه در محیط شکلات آگار، جهت شمارش تعداد پرگنه (CFU) کشت داده شد. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در گرم‌خانه ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. توانایی تولید بیوفیلیم باکتری‌های جداسازی شده، به دو روش مشاهده میکروسکوپی و میکروپلیت مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: در روش کشت مستقیم باکتری‌ها در ۹ نمونه از ۱۵ لوله داخل‌نایی رشد کردند و در شمارش کلی تعداد پرگنه‌ها (CFU) ۶ نمونه از ۱۵ مورد نیز رشد باکتری مشاهده شد. در ارزیابی تولید بیوفیلیم با روش میکروسکوپی، ۷ نمونه از ۱۱ جدایه مثبت و در روش میکروپلیت دو نمونه مثبت، دو نمونه ضعیف و ۷ نمونه منفی گزارش شدند. باکتری‌های جداسازی شده شامل ۴ مورد *آسینتوباکتر*، ۲ مورد *استافیلوکوکوس*، ۲ مورد *کریزیوباکتریوم* / *اسفنگوموناس* و یک مورد از هر کدام از باکتری‌های *کلیسیلا*، *باسیلوس* و *آلکالیژنر* بودند.

نتیجه‌گیری نهایی: بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه تجهیزات بیهوشی می‌توانند سبب انتقال آلودگی‌های میکروبی به مجاری تنفسی شوند و از آنجا که بیوفیلیم‌های میکروبی، توسط روش‌های معمول ضدعفونی از بین نمی‌روند و این بیوفیلیم‌ها نقش به‌سزایی در مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی ایفا می‌کنند، حضور این آلودگی‌ها در تجهیزات و دستگاه بیهوشی یک خطر جدی برای سلامت حیوانات در بخش جراحی محسوب می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: آلودگی باکتریایی، بیوفیلیم، حیوانات کوچک، دستگاه بیهوشی، لوله داخل‌نایی

مقدمه

در سال‌های اخیر بیهوشی دامپزشکی پیشرفت چشم‌گیری داشته است به گونه‌ای که امروزه در بسیاری از بیمارستان‌های آموزشی دامپزشکی، وسایل و روش‌های پیشرفته در بیهوشی انسانی بکارگرفته می‌شود. بیهوشی عمومی یکی از روش‌های بیهوشی است که به دلیل مسمومیت قابل برگشت سیستم اعصاب مرکزی، بیمار تحریکات دردناک را حس نمی‌کند. این نوع بیهوشی شامل سه مرحله‌ی القا، نگهداری و بازگشت از بیهوشی است (۱). یکی از روش‌های نگهداری بیهوشی استفاده از بیهوشی استنشاقی است. در بیهوشی استنشاقی، داروها به شکل بخار یا گاز از راه دستگاه تنفس تجویز می‌شوند. این داروها عموماً از راه لوله‌های داخل‌نایی به شش‌ها منتقل می‌شوند. استفاده از لوله‌های داخل‌نایی بخشی از مدیریت بیهوشی در سگ‌ها و گربه‌ها است. این لوله‌ها در اندازه‌ها و جنس‌های مختلف وجود دارند (۱، ۲). از مزایای استفاده از لوله داخل‌نایی می‌توان به تأمین اکسیژن در طول بیهوشی، تسهیل تهویه مکانیکی، محافظت از راه‌های هوایی تحتانی در برابر آسپیراسیون مایعات و جلوگیری از آلودگی محیط با گازهای بیهوشی اشاره کرد (۳).

با این حال لوله گذاری در سگ‌ها و گربه‌ها با عوارضی همراه بوده که ممکن است در طی عمل جراحی، مدت کوتاهی پس از آن یا حتی پس از روزها یا هفته‌ها آشکار شود. عوارض جزئی مانند سرفه، آسیب به بافت نرم حفره دهان یا حنجره و عوارض جدی‌تر (تهدید کننده زندگی) مانند ادم حنجره، تنگی و نکروز نای از جمله آسیب‌های ناشی از لوله‌گذاری هستند. متأسفانه بر خلاف طب انسانی، مقالات موجود در زمینه‌ی عوارض ناشی از لوله‌گذاری در دامپزشکی بسیار کم است. مطالعات منتشر شده نشان می‌دهد که لوله‌گذاری داخل‌نایی در گربه‌ها منجر به افزایش خطر ابتلا به عوارض ذکر شده و افزایش شانس مرگ در حین بیهوشی می‌شود. به علاوه چندین مورد ابتلا به عوارض جدی گزارش شده است. نشت از کاف لوله‌های داخل‌نایی شایع‌ترین عارضه در گربه‌ها و

سگ‌ها است. در گربه‌ها انسداد لوله دومین عارضه شایع است (۳).

این لوله‌ها با اثرات مستقیم بر روی راه‌های هوایی، فرآیندهای دفاعی بدن در محل را تحت تأثیر قرار می‌دهند. لوله‌گذاری امکان اتصال باکتری‌ها به سلول‌های تراکتوبرونشیال را افزایش می‌دهد که موجب افزایش کلونیزه شدن باکتری‌ها و احتمال وقوع ذات‌الریه می‌شود. به علاوه سطح داخلی این لوله‌ها محل مناسبی برای اتصال باکتری‌ها و در نتیجه مخزنی از میکروارگانیسم‌ها است. باکتری‌هایی که به سطح لوله چسبیده‌اند ممکن است با جریان هوای استنشاق شده توسط ونتیلاتور و روش‌های تهجمی مانند برونکوسکپی و لوله‌گذاری، از سطح لوله جدا و به راه‌های هوایی منتقل شوند (۴). یکی از مهم‌ترین عوارض پس از خروج لوله نایی هم در گربه و هم در سگ سرفه است. پارگی و نکروز نای به شکل معنی‌داری در گربه‌ها بیشتر از سگ‌ها رخ می‌دهد. در عین حال تغییر صدا، مشکل در تنفس و برونشیت یا ذات‌الریه در سگ‌ها پس از خارج کردن لوله بیشتر از گربه‌ها گزارش شده است (۳). بنابراین این لوله‌ها منبع مهمی برای تلقیح باکتری‌ها به شش‌ها هستند (۵) و محققان لوله‌گذاری داخل‌نایی را از مهم‌ترین علل انتقال باکتری‌ها به سیستم تنفسی و بروز عفونت‌های ریه می‌دانند (۶).

ذات‌الریه مربوط به دستگاه تهویه (Ventilator-Associated Pneumonia: VAP) عفونتی شایع به دنبال لوله‌گذاری و تهویه مکانیکی یا فرآیندهای بیهوشی استنشاقی است و منجر به افزایش احتمال مرگ و میر و هزینه‌های اضافی برای سیستم مراقبت‌های بهداشتی می‌شود (۵). VAP در ۲۸-۸ درصد از بیماران لوله‌گذاری شده اتفاق می‌افتد و بروز آن با مدت زمان لوله گذاری افزایش می‌یابد (۶). VAP عفونتی چند عاملی است که بیوفیلیم‌های میکروبی نقش مهمی در ایجاد و رخداد مجدد آن دارند. از اوایل دهه هشتاد رشد بیوفیلیم در لوله‌های داخل نایی به عنوان علتی نهفته برای VAP شناخته می‌شود.

ونتیلاتور، یکی باکتری‌های موجود در مسیرهای هوایی دستگاه تنفسی فوقانی و دستگاه گوارش فوقانی و دیگری استنشاق مواد به مسیرهای هوایی می‌باشد (۱۴).

از آنجایی که آلودگی تجهیزات و دستگاه‌های بیهوشی یکی از شایع‌ترین راه‌های انتقال عفونت‌های ثانویه و عفونت‌های مربوط به ونتیلاتور در پزشکی است و با توجه به ضرورت یافتن درک درست از وضعیت آلودگی لوله‌ها در دامپزشکی، این مطالعه به منظور بررسی بار میکروبی تجهیزات و دستگاه بیهوشی به عنوان یک فاکتور خطر ساز برای سلامت حیوانات انجام گردید (۱۵). بر همین اساس درک بهتر از ماهیت جوامع بیوفیلم که روی لوله‌های داخل‌نایی تشکیل می‌شوند ممکن است منجر به توسعه استراتژی‌های پیشگیرانه برای ذات‌الریه‌های مربوط به ونتیلاتور شود.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری و کشت میکروبی: نمونه‌گیری میکروبیولوژیک از لوله‌های داخل‌نایی، کانیستر (Canister) و سودالایم انجام شد. به این منظور ۱۵ عدد لوله‌ی داخل‌نایی با قطر ۹-۴ میلی‌متر که حداقل ۲۴ ساعت از آخرین شست و شوی آن‌ها گذشته بود، انتخاب و سطح خارجی آنها با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی گردید. پس از حذف بادکنک انتهایی لوله (تصویر ۱-۱A)، پنج سانتی‌متر از امتداد بعدی لوله، قطعه یک (تصویر ۱-۱B)، و در نهایت ۵ سانتی‌متر دیگر از طول لوله، قطعه ۲ (تصویر ۱-۱C)، جدا شده و نمونه‌گیری از آن انجام شد. از سطوح داخلی لوله‌های داخل‌نایی (قطعه یک) با استفاده از سواب استریل آغشته به سرم فیزیولوژی نمونه‌برداری انجام شد و بلافاصله در سطح محیط‌های انتخابی شکلات آگار، مک‌کانکی آگار، ستریماید آگار و مانیتول‌سالت آگار بصورت خطی کشت داده شد.

جهت شمارش پرگنه (CFU) قطعه دو از هر لوله، در ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی در یک فالكون استریل قرارگرفت و ۳ بار (هر بار به مدت ۳۰ ثانیه) با دور بالا ورتکس شد. از هر فالكون ۰/۱ میلی‌لیتر در سطح محیط

بیوفیلم، اجتماعات میکروبی متصل به سطوح زنده یا غیرزنده هستند که توسط مواد پلی‌مری خارج سلولی احاطه شده‌اند (۷، ۸). تشکیل بیوفیلم یک استراتژی محافظتی برای میکروارگانیسم‌ها است که در برابر سیستم ایمنی میزبان و اثرات زیان‌بار ترکیبات ضدعفونی‌کننده و آنتی‌بیوتیک‌ها از آن‌ها حفاظت کرده و شانس بقای آن‌ها را افزایش می‌دهد (۹-۱۱). بیوفیلم به دلیل نقشی که در عفونت‌های مربوط به وسایل پزشکی در محیط‌های درمانی دارد به موضوعی نگران‌کننده تبدیل شده است.

باکتری‌ها توانایی تحمل و انطباق با طیف وسیعی از شرایط نامناسب محیطی را دارند. مکانیسم‌های اولیه‌ای که باعث تسهیل این سازگاری می‌شود منجر به ایجاد و حفظ بیوفیلم‌ها می‌گردد. به دلیل خواص بیوفیلم‌ها، بیماری‌های مربوط به آن‌ها، نیازمند روش‌های جدید برای پیشگیری، تشخیص و درمان هستند (۱۲). موفقیت درمان بسیاری از عفونت‌های باکتریایی مثل زخم‌های مزمنی که بهبود نیافته‌اند یا انواع ورم پستان، با توانایی تولید بیوفیلم باکتری‌ها در ارتباط است. اگر چه اطلاعات منتشر شده از بروز بیوفیلم در عفونت‌های دامپزشکی اندک است اما به نظر می‌رسد به اندازه‌ی علم پزشکی حائز اهمیت باشد. زخم‌ها و ورم‌پستان دو مورد از بیشترین گزارشات مربوط به حضور بیوفیلم در علم دامپزشکی است. در مورد کلینیک‌های جراحی اطلاعات اندکی در دسترس است؛ اما، در مورد تجهیزات مورد استفاده در این کلینیک‌ها، حضور بیوفیلم در وسایل و ابزار مورد استفاده برای اندوسکوپی و بیهوشی و عدم ضدعفونی موثر این وسایل منجر به ایجاد عفونت در حیوانات می‌شود که از این ابزارها استفاده می‌کنند.

باکتری‌هایی که در ایجاد VAP دخالت دارند بسیار متغییر هستند. تجمع میکروارگانیسم‌ها در دهان و حلق و بینی عاملی برای توسعه VAP است. استرس ناشی از عوامل مختلف از قبیل بیماری، جراحی یا عفونت سبب جایگزین شدن فلور طبیعی توسط میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌شوند (۱۳). دو مسیر عمده ورود پاتوژن‌های ناشی از

آگار شکلاتی کشت داده شد و به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از دیواره Canister، بخش‌های بالایی و پایینی لوله‌ی خرطوم‌ی متصل به دستگاه بیهوشی (Breathing circuit tubing) و سودولایم با استفاده از سوآپ آغشته به سرم فیزیولوژی استریل یک نمونه گرفته شد. همه این سوآپ‌ها پس از نمونه‌گیری، مشابه نمونه‌های قبلی کشت داده شدند و از باقی‌مانده محلول پس از افزودن ۱ سی‌سی سرم فیزیولوژی و ۳ بار (هر بار ۳۰ ثانیه) ورتکس، ۱۰۰ میکرولیتر در سطح محیط کشت شکلات آگار، جهت شمارش پرگنه‌ها کشت داده شد. بعد از گذشت زمان لازم، رشد میکروبی مورد بررسی قرار گرفت.

تست‌های تشخیصی و آزمون‌های افتراقی جهت تشخیص نوع باکتری: شناسایی و جداسازی باکتری‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و افتراقی شامل رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده مستقیم باکتری در زیر میکروسکوپ، تست‌های کاتالاز و اکسیداز، تست اوره‌آز، محیط کشت سیمون سیترات، توانایی احیای نیتрат، تست Esculin انجام شد (۱۶، ۱۷).

بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی: در این مطالعه به منظور تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های جداسازی شده، از روش انتشار دیسک استفاده شد (۱۸، ۱۹). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفتوفور (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، آموکسی‌سیلین (۲۰ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، تری‌متوپریم-سولفانامید (۱۲۵/۲۳/۷۵ میکروگرم)، پنی‌سیلین (۱۰ واحد)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، فلورفنیکل (۳۰ میکروگرم)، آزیترومایسین (۱۵ میکروگرم)، انروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، کلیستین (۱۰ میکروگرم) و داکسی‌سایکلین (۳۰ میکروگرم) (شرکت پادتن طب، تهران، ایران) برای ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم: جهت ارزیابی تولید بیوفیلم یک پرگنه شاخص از هر گروه انتخاب شد و توانایی تولید بیوفیلم با استفاده از روش میکروپلیت مورد سنجش قرار گرفت. پرگنه‌های باکتری به محیط تریپتیک سوی براث (TSB) تلقیح شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن، سوسپانسیون باکتری در محیط تریپتیک سوی براث ۱:۱۰ رقیق شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای پلی‌استیرین منتقل گردید. یک ردیف چاهک حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون باکتری به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از پایان زمان انکوباسیون محتوی داخل چاهک‌ها خالی و چاهک‌ها به آرامی، ۳ مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل، شسته شد و در دمای محیط قرار گرفت تا پلیت‌ها خشک شود. جهت فیکس کردن بهتر بیوفیل‌ها از اتانول ۹۶ درصد نیز به میزان ۲۰۰ میکرولیتر استفاده شد و پس از ۱۵ دقیقه، الکل خارج و پلیت‌ها در محیط آزمایشگاه خشک گردید. به تمام خانه‌ها ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۲ درصد اضافه و پس از ۵ دقیقه پلیت‌ها توسط آب مقطر استریل شسته شد تا رنگ اضافی از چاهک‌ها خارج شود. سپس به چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ درصد به عنوان حلال اضافه شد و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت جذب نوری در طول موج ۵۸۰ نانومتر با استفاده از قرائت‌کننده الیزا اندازه‌گیری شد (۷). به منظور بررسی میکروسکوپی بیوفیلم قبل از اضافه کردن اسید استیک ابتدا پلیت با استفاده از میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت معیار قضاوت وجود بیوفیلم در روش میکروسکوپی مشاهده توده‌ها، خوشه‌ها یا لایه‌های متراکم و یکپارچه‌ای که به رنگ بنفش تیره یا آبی متمایل به بنفش درآمده‌اند و به کف چاهک چسبیده‌اند، بود (۲۰).

نتایج

از ۱۹ نمونه‌ی مورد آزمایش پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان انکوباسیون، در ۱۱ نمونه (۵۸ درصد) رشد باکتری مثبت بود. شصت درصد از نمونه‌های مربوط به لوله‌های داخل‌نایی بر روی محیط شکلات آگار و ۴۶ درصد از این نمونه‌ها بر روی محیط مک‌کانکی آگار رشد کردند. این درحالی است که تنها یک مورد از نمونه‌های مربوط به دستگاه بیهوشی بر روی محیط شکلات آگار رشد کرد و هیچ یک از نمونه‌های مربوط به دستگاه بیهوشی بر روی محیط مک‌کانکی آگار رشد نکردند. در دو نمونه که از بخش‌های بالایی و پایینی لوله‌ی خرطومی متصل به دستگاه بیهوشی نمونه‌گیری شده بود آلودگی شدید قارچی مشاهده شد (جدول ۱).

بر اساس آزمون شمارش میکروبی (CFU) انجام شده در این مطالعه، از ۱۵ نمونه ۶ مورد مثبت گزارش شد. در نمونه شماره یک به علت آلودگی شدید و ماهیت موکئیدی پرگنه‌ها CFU در رقت ۰/۱ میلی‌لیتر و در رقت‌های مورد بررسی غیر قابل شمارش بود که نشانگر آلودگی بالای لوله‌های داخل‌نایی بوده است.

از ۱۱ نمونه جداسازی شده ۷ جدایه باسیل گرم منفی، ۲ جدایه کوکسی گرم مثبت، ۱ جدایه کوکوباسیل گرم منفی و ۱ جدایه باسیلوس تشخیص داده شد (جدول ۲).

در ارزیابی تولید بیوفیلم به روش میکروسکوپی، تولید بیوفیلم در ۶۳ درصد مثبت گزارش شد. در روش میکروپلیت چاهک‌هایی با میانگین جذب نوری بیش از یک، مثبت، در حدود ۰/۵ ضعیف و کمتر از آن منفی گزارش شدند. به این ترتیب تولید بیوفیلم در ۲ نمونه مثبت، در ۲ نمونه ضعیف و در سایر نمونه‌ها منفی گزارش شد (جدول ۳ و ۴).

نتایج حاصل از بررسی توانایی تولید بیوفیلم به دو روش میکروسکوپی و میکروپلیت نشان داد که روش میکروسکوپی موارد مثبت بیشتری نسبت به روش میکروپلیت نشان داده است به گونه‌ای که در روش

میکروسکوپی ۷ مورد مثبت (۶۳ درصد) و با استفاده از روش میکروپلیت ۲۷ درصد مثبت و ۹ درصد ضعیف گزارش شد که در مجموع کمتر از روش میکروسکوپی بود.

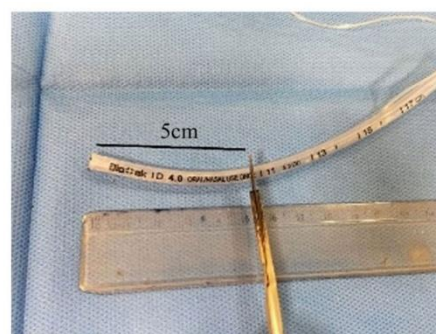
نتایج حاصل از بررسی‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی، طیف وسیعی از مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش نشان داد (جدول ۵). از این میان باکتری کریزیوباکتر/اسفنگوموناس با بیشترین مقاومت نسبت به جدایه‌های دیگر به ۱۱ آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان داد و *استافیلوکوکوس/اورئوس* با کمترین مقاومت نسبت به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده حساس بود. از میان دیگر جدایه‌ها، گونه‌های دیگر *استافیلوکوکوس* و *کلبسیلا* حداقل به ۱۰ آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند. و بقیه جدایه‌ها شامل *آسینتو باکتر*، *باسیلوس* و *آلکالیژنر* حداقل به بیش از ۶ آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند (جدول ۶).

بحث

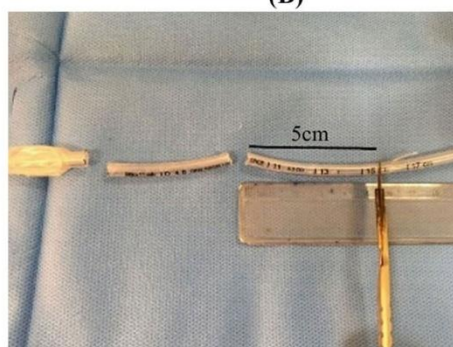
هدف از انجام این مطالعه بررسی آلودگی‌های میکروبی لوله‌های داخل‌نایی و دستگاه بیهوشی و بررسی توانایی تولید بیوفیلم به عنوان یک شاخص بیماری‌زایی و مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی و سیستم دفاعی میزبان بود. نمونه‌گیری از ۱۵ عدد لوله‌ی داخل‌نایی انجام شد و بعد از بررسی‌های میکروبی، رشد باکتری در ۹ لوله مثبت گزارش شد. در مطالعه‌ای که توسط Sottile - در سال ۱۹۸۶ بر روی ۲۵ لوله (PVC)، لوله داخل‌نایی یا تراکتوستومی) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) انجام گرفت ساختارهای ناهمگونی در سطح داخلی ۸۴ درصد از لوله‌ها و ۱۶ درصد از لوله‌های داخل‌نایی مشاهده شد. کشت باکتریایی برای ۲۳ عدد از لوله‌های داخل‌نایی انجام گرفت و در ۸۳ درصد موارد مثبت اعلام شد (۲۴).

بر اساس آزمون شمارش میکروبی (CFU) انجام شده در این مطالعه، از ۱۵ نمونه ۶ مورد مثبت گزارش شد. در نمونه شماره یک به علت آلودگی شدید و ماهیت

موکئیدی پرگنه‌ها CFU در رقت ۰/۱ میلی‌لیتر و در رقت‌های مورد بررسی غیر قابل شمارش بود که نشانگر آلودگی بالای لوله‌های داخل‌نایی بوده است. علاوه بر این از بخش بالایی و پایینی لوله‌ی خرطومی متصل به دستگاه بیهوشی نمونه‌گیری انجام شد که رشد باکتری در آن‌ها نیز مثبت گزارش شد. Bowers در سال ۲۰۰۲ در مطالعه‌ی خود نشان داد که بسیاری از ارگانیسم‌ها در صفحات ماشین‌آلات بیهوشی زنده می‌مانند (۲۵). همچنین Mortazavi و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مطالعه‌ی خود بیان کردند که در دستگاه‌های بیهوشی مرحله قبل و پس از شستشو، آلودگی باکتریایی وجود دارد که این آلودگی با روش‌های متداول ضدعفونی از بین نمی‌رود (۲۳). در این مطالعه، در بسیاری موارد آلودگی شدید قارچی در محیط‌های کشت مشاهده شد. در



(B)



(C)

تصویر ۱: (A) جدا کردن و حذف بادکنک انتهای لوله داخلی، (B) ایجاد قطعه ۱، (C) ایجاد قطعه ۲

جدول ۱: جدول توصیفی رشد میکروبی براساس نوع نمونه و محیط کشت.

نوع نمونه	تعداد نمونه	شکلات آگار (تعداد، درصد)	مک کانکی آگار (تعداد، درصد)	رشد کلی میکروبی (تعداد، درصد)	رشد قارچی (تعداد، درصد)
لوله های داخل نایی	۱۹	۶۰٪، ۱۱	۴۶٪، ۹	۵۸٪، ۱۱	۰
دستگاه بیهوشی	۴	۱	۰	۱	۲

جدول ۲: جنس و گونه باکتری های شناسایی شده.

نوع جدایه	تعداد	نوع باکتری	تعداد نمونه های آلوده با باکتری
باسیل گرم منفی	۷	<i>Acinetobacter</i> spp.	۴
		<i>Alcaligenes</i> spp.	۱
		<i>Chryseobacterium/Sphingomonas</i>	۲
کوکسی گرم مثبت	۲	<i>Staphylococcus aureus</i>	۱
		<i>Staphylococcus</i> spp.	۱
کوکوباسیل گرم منفی	۱	<i>Klebsiella</i> spp.	۱
باسیلوس	۱	<i>Bacillus</i> spp.	۱

جدول ۳: مقایسه نتایج دو روش ارزیابی بیوفیلم.

روش ارزیابی	مثبت (تعداد/درصد)	ضعیف (تعداد/درصد)	منفی (تعداد/درصد)	توضیحات
میکروسکوپی	۷ (۶۳ درصد)	-	۴ (۳۷ درصد)	تشخیص با مشاهده مستقیم
میکروپلیت	۲ (۱۸ درصد)	۲ (۹ درصد)	۷ (۶۳ درصد)	جذب نوری در طول موج ۵۸۰ نانومتر

جدول ۴: مقایسه‌ی نتایج حاصل از ارزیابی توانایی تولید بیوفیلم توسط باکتری‌ها با دو روش مشاهده میکروسکوپی و روش میکروپلیت.

نوع باکتری	مشاهده میکروسکوپی	روش میکروپلیت
<i>Klebsiella</i> spp.	۳-۲ مثبت	مثبت
<i>Acinetobacter</i> spp.	منفی	منفی
<i>Staphylococcus aureus</i>	۱ مثبت	مثبت
<i>Staphylococcus</i> spp.	۲-۱ مثبت	ضعیف
<i>Acinetobacter</i> spp.	منفی	منفی
<i>Acinetobacter</i> spp.	منفی	منفی
<i>Alcaligenes</i> spp.	۲ مثبت	منفی
<i>Bacillus</i> spp.	منفی	منفی
<i>Acinetobacter</i> spp.	۱ مثبت	مثبت
<i>Chryseobacterium/Sphingomonas</i>	۲-۱ مثبت	منفی
<i>Chryseobacterium/Sphingomonas</i>	۲ مثبت	منفی

جدول ۵: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین جدایه‌ها.

جدایه‌ها	AMX	CTF	GEN	AMP	COL	DOX	NFX	ERY	FFN	PEN	AZM	SXT
<i>Klebsiella</i> spp.	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R
<i>Acinetobacter</i> spp.	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus</i> spp.	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
<i>Acinetobacter</i> spp.	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R
<i>Acinetobacter</i> spp.	R	R	S	R	R	S	R	S	R	R	S	R
<i>Alcaligenes</i> spp.	I	R	S	R	S	S	R	S	R	R	S	R
<i>Bacillus</i> spp.	R	R	S	R	R	S	S	I	S	R	S	R
<i>Acinetobacter</i> spp.	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	R
<i>Chryseobacterium/Sphingomonas</i>	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R

AMX: Amoxicillin, CTF: *Ceftiofur*, GEN: Gentamicin, AMP: Ampicillin, COL: Colistin, DOX: Doxycycline, NFX: Enrofloxacin, ERY: Erythromycin, FFN: Florfenicol, SXT: Trimethoprim+Sulphamethoxazole, PEN: Penicillin, AZM: Azithromycin. R: Resistant, S: Sensitive, I: Intermediate

نکته: با توجه به اینکه الگوی مقاومت و حساسیت برخی جدایه‌های شناسایی شده در این مطالعه توسط موسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) گزارش نشده است، برای جدایه‌های گرم مثبت از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و برای جدایه‌های گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه به عنوان Breakpoint استفاده شد.

جدول ۶: مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های باکتریایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی

نام جدایه	تعداد آنتی‌بیوتیک‌های مقاوم	مقاومت
<i>Chryseobacterium/Sphingomonas</i>	۱۱	تقریباً همه موارد
<i>Staphylococcus aureus</i>	۰	به همه حساس
<i>Staphylococcus spp.</i>	≥۱۰	مقاومت گسترده
<i>Klebsiella spp.</i>	≥۱۰	مقاومت گسترده
<i>Acinetobacter spp.</i>	≥۶	چند گانه
<i>Bacillus spp.</i>	≥۶	متوسط
<i>Alcaligenes spp.</i>	≥۶	متوسط

باکتری‌های شناسایی شده در این مطالعه به ترتیب شامل چهار مورد *آسینتوباکتر*، دو مورد *استافیلوکوکوس*، دو مورد *کریزیوباکتر* / *اسفنگوموناس*، و یک مورد از هر کدام از باکتری‌های *کلبسیلا*، *باسیلوس* و *آلکالیژنر* می‌باشد. بررسی‌های الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این مطالعه نشان داد که *کریزیوباکتر* / *اسفنگوموناس* و پس از آن *کلبسیلا* و *استافیلوکوکوس* دارای بیشترین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی بودند و بقیه جدایه‌ها نیز درصد بالایی از مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه نشان دادند. اولین گزارشات دامپزشکی در مورد عفونت با *آسینتوباکتر* مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک در سگ‌ها و گربه‌ها در سال‌های ۱۹۹۸-۱۹۹۹ نشان داد که این سویه پس از تمیز کردن و ضدعفونی واحد مراقبت‌های ویژه حیوانات به طور کلی از بین رفت. دومین گونه‌ی مقاوم از این باکتری در سال ۲۰۰۰ شناسایی و منجر به ایجاد موج جدیدی از عفونت‌ها شد. این سویه در بین بیماران در اسب‌داری‌های مجاور منتقل می‌شد (۲۸). *آسینتوباکتر بومانی* یک پاتوژن بیمارستانی است که با بیماری و مرگ و میر بالا در انسان همراه است. به نظر می‌رسد اکثر عفونت‌های ناشی از *آسینتوباکتر بومانی* در دامپزشکی هم از نوع بیمارستانی باشد. این باکتری با پیودرما در سگ، فاشییت نکروزان در گربه (feline necrotizing fasciitis)، عفونت مجاری ادراری، ترومبوفلیبیت (equine thrombophlebitis) و عفونت مجاری تحتانی تنفسی در اسب در ارتباط است

(۲۹). در مطالعه‌ی انجام شده به وسیله‌ی Vaneechoutte و همکاران در سال ۲۰۰۰ مشخص شد که این عامل در اکثر موارد منجر به ایجاد عفونت‌های موضعی، اغلب همراه با علائم عمومی و به ندرت منجر به مرگ حیوان می‌شود. همچنین این عامل از اسب‌هایی که کاتتر وریدی در بدن آنها وجود داشت جدا سازی شد (۳۰). گونه‌های *آسینتوباکتر* جدا شده از نمونه‌های کلینیکی دامپزشکی دارای ویژگی‌های مولکولی یکسانی با نوع انسانی این باکتری‌ها می‌باشند (۳۱). این باکتری همراه با گونه‌های دیگر مثل *انتروکوکوس فکالیس*، *استریتوکوکوس* / *ینترمدیوس* از زخم‌های جراحی آلوده و سایر انواع عفونت‌ها در یک بیمارستان آموزشی دامپزشکی جدا شده است (۳۲). در حالی که ترکیبات کاربانی‌آکسین آخرین انتخاب در درمان عفونت‌های ناشی از *آسینتوباکتر* در علم پزشکی می‌باشد، اسب‌های مبتلا به عفونت‌های ناشی از این باکتری به ترکیبات کاربانی‌آکسین مقاوم بوده که این موضوع علاوه بر پیچیده کردن مسیرهای درمانی یک خطر عمومی برای سلامتی انسان می‌باشد زیرا این حیوانات یک مخزن بالقوه از باکتری مقاوم هستند (۳۳). مطالعه حاضر می‌تواند به عنوان یکی از اولین گزارشات در مورد اهمیت این باکتری در بیمارستان‌های دامپزشکی در ارتباط با تجهیزات جراحی و بیهوشی به شمار آید.

در مطالعه حاضر مانند آنچه توسط Gil-Perotin و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی بیوفیلم لوله‌های داخل

باکتری کلبسیلا در هر دو روش بیوفیلم قوی‌تری در لوله‌های داخل‌نایی تشکیل داده است همچنین CFU آن، از سایر نمونه‌ها بیشتر بوده است، پیشنهاد می‌شود. تحقیقات آینده، نقش این باکتری را در ایجاد عفونت‌های تنفسی یا سایر عفونت‌ها در حیوانات مورد بررسی قرار دهد. همچنین از بخش بالایی و پایینی لوله خرطومی متصل به دستگاه بیهوشی باکتری به نام کریزیوباکتر/سفن‌گوموناس جدا شده است که این مطالعه اولین گزارش در مورد جداسازی این باکتری از نمونه‌های دامپزشکی است و با توجه به اینکه در روش میکروسکوپی مستقیم تولید بیوفیلم در این نمونه مثبت گزارش شده است باید مورد توجه بیشتری قرار بگیرد.

در اغلب بیماران مبتلا به VAP چند باکتری با هم دخالت می‌کنند که اکثراً توانایی تشکیل بیوفیلم و تشکیل پرگنه در مسیرهای تنفسی را دارند (۴۰). استافیلوکوک‌ها از جمله باکتری‌هایی هستند که در ایجاد VAP دخالت دارند. از آنجا که استافیلوکوک‌ها باکتری‌های معمول پوست و سطوح مخاطی انسان و بسیاری از پستانداران هستند، به راحتی می‌توانند در طول جراحی توسط هر دستگاه پزشکی که وارد بدن می‌شود، منتقل شوند. سیستم نظارت بر عفونت‌های بیمارستانی (Hospital infection monitoring system)، استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی مثل استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس را شایع‌ترین عامل ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و عفونت‌های ماندگار در ابزار پزشکی که حاصل بیوفیلم‌ها هستند، معرفی کرده است که درصد بالایی مقاوم به متی‌سپلین هستند. علاوه بر مقاومت خاص آنتی‌بیوتیکی بر پایه‌ی عواملی مثل مقاومت ژنتیکی، کروموزومی یا پلاسمیدی، مکانیسم مقاومت غیراختصاصی که تشکیل بیوفیلم بدون شک از مهم‌ترین آنها است، در استافیلوکوک‌ها وجود دارد. عفونت‌های مربوط به ابزار و دستگاه‌ها، مربوط به بیوفیلم هستند و در حقیقت تشکیل بیوفیلم مهم‌ترین نکته در بیماری‌زایی این وسایل است (۴۱). آسینتوباکتر بومانی از دیگر باکتری‌هایی است که در بیمارستان‌ها، بطور نسبتاً

نایی انجام شد (۳۴) بیشترین فراوانی جدایه‌ها مربوط به گونه‌ی آسینتوباکتر و استافیلوکوکوس بود، هرچند در مطالعه‌ی Vandecandelaere و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی لوله‌های داخل‌نایی و کشت مستقیم آنها بیشترین باکتری جدا شده استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا بود (۳۵) که این نتایج مشابهی نتایج حاصل از مطالعه‌ی انجام شده توسط Pan و همکاران در سال ۲۰۱۷ است (۱۵). Diaz-Blanco و همکاران در سال ۱۹۸۹ در بررسی لوله‌های داخل‌نایی در نوزادان تحت تهویه مکانیکی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی دریافتند که بیشترین آلودگی با گونه‌های استافیلوکوکوس و پس از آن سودوموناس و کمپیلوباکترنومونیا بوده است (۳۶) که این نتایج مشابه نتایج حاصل از مطالعه‌ی Inglis و همکاران در سال ۱۹۸۹ بود (۳۷). همچنین بر خلاف مطالعه‌ی de Oliveira Ferreira و همکاران در سال ۲۰۱۶ (۳۸) و Diaz-Blanco و همکاران در سال ۱۹۸۹، در مطالعه حاضر هیچ گونه آلودگی با گونه‌ی سودوموناس یافت نشد. علاوه بر این یک مورد آلودگی با کلبسیلا دیده شد که مشابه نتایج حاصل از مطالعه‌ی de Oliveira Ferreira و همکاران در سال ۲۰۱۶ بود. در مطالعه Raveendra و همکاران در سال ۲۰۲۳ پس از آسینتوباکتر بومانی، کلبسیلا پونومونیا بیشترین فراوانی در بین باکتری‌های تولیدکننده بیوفیلم در لوله داخل‌نایی را داشت (۳۹).

در این مطالعه از دو روش میکروپلیت و مشاهده میکروسکوپی جهت ارزیابی تولید بیوفیلم جدایه‌های باکتریایی استفاده شد. با توجه به نتایج موجود در روش میکروسکوپی تولید بیوفیلم در ۷ نمونه از ۱۱ جدایه مثبت گزارش شد. این در حالی است که در نتایج حاصل از روش میکروپلیت با توجه به میانگین جذب نوری نمونه‌ها، ۲ نمونه مثبت، ۲ نمونه ضعیف و باقی نمونه‌ها منفی گزارش شد. در این روش تولید بیوفیلم در باکتری‌های کلبسیلا و استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به سایر باکتری‌ها قوی‌تر بود. با توجه به اینکه نمونه‌ی

بیشتر از لوله‌های داخل‌نایی است زیرا برخی از اجزای دستگاه قابل تعویض و ضدعفونی نیست. با این حال بهترین راه برای جلوگیری از ایجاد آلودگی و به دنبال آن انتقال عفونت به بیمار، استفاده از لوله‌های داخل‌نایی یا لوله‌ها و سایر قطعات لاستیکی مربوط به دستگاه بیهوشی به صورت مجزا برای هر حیوان و از بین بردن آنها پس از استفاده است.

با توجه به اینکه سطح لوله‌های داخل‌نایی محیطی مناسب جهت اتصال باکتری‌ها و تشکیل بیوفیلم است و تشکیل بیوفیلم‌های باکتریایی در اولین ساعات لوله‌گذاری هم دیده شده است، با توجه به انتقال این اجتماعات میکروبی به بخش‌های تحتانی سیستم تنفسی و با توجه به مقاومت بالای بیوفیلم به آنتی‌بیوتیک‌ها و سیستم ایمنی میزبان، پیشنهاد می‌شود سطوح این لوله‌ها با روش‌های مناسب و موثر ضدعفونی و استفاده از لوله‌های داخل‌نایی یا سایر تجهیزات بیهوشی به شکل استریل برای هر حیوان، بررسی گردد. همچنین بررسی دستگاه بیهوشی از نظر میزان بار میکروبی و یا استفاده از راهکارهای عملی دیگر جهت جلوگیری از حضور باکتری‌ها یا تشکیل بیوفیلم در داخل لوله‌های نایی و دستگاه بیهوشی پیشنهاد می‌شود.

سپاس‌گزاری

از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد برای تامین امکانات آزمایشگاهی و کمک به انجام این طرح قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

پژوهشگران هیچ‌گونه تعارض منافی را در این مطالعه شناسایی نکرده‌اند.

شایع مجاری تنفسی را درگیر می‌کند. از میان گونه‌های مختلف *آسینتوباکتر* گونه‌ای که بیش از همه از نمونه‌های کلینیکی جدا شده *آسینتوباکتر بومانی* است (۴۳). این باکتری همچنین می‌تواند عفونت‌های بیمارستانی مجرای ادراری و عفونت‌های زخم ایجاد کند که در نهایت ممکن است به صورت سپتی‌سمی پیشرفت نماید (۴۴). مقاومت گونه‌های *آسینتوباکتر* به ویژه *آسینتوباکتر بومانی* به آنتی‌بیوتیک‌ها نه تنها در پزشکی بلکه در دامپزشکی و حتی در محیط زیست در سراسر جهان مشاهده شده است و همین موضوع باعث ایجاد نگرانی با این گونه باکتریایی شده است (۴۵).

Thorarinsdottir و همکاران در سال ۲۰۲۰ به بررسی تاثیر جنس و ترکیبات لوله داخل‌نایی و تشکیل بیوفیلم در آن‌ها پرداختند. این مطالعه نشان داد که تشکیل بیوفیلم در لوله‌های داخل‌نایی از جنس PVC با پوشش سیلیکون نسبت به لوله‌هایی نایی بدون پوشش کمتر است (۴۶). بنابراین انتخاب و استفاده از تکنیک‌های مناسب جهت ضدعفونی موثر این وسایل موضوع بسیار مهمی است (۴۷).

نتیجه‌گیری نهایی

از آنجایی که بیوفیلم باکتری‌ها با روش‌های معمول ضدعفونی از بین نمی‌رود حضور آن در تجهیزات و دستگاه بیهوشی یک خطر جدی برای سلامت بیمار محسوب می‌شود. زیرا علاوه بر امکان ابتلا حیوان به این آلودگی‌ها، در صورت درگیری حیوان با این فرم از باکتری، درمان‌های معمول ضد میکروبی در از بین بردن آلودگی بی‌تاثیر بوده و منجر به مزمن شدن بیماری و پیچیده شدن درمان می‌شود. اهمیت آلودگی دستگاه بیهوشی

منابع:

1. Lees P. Veterinary anaesthesia: LW Hall and KW Clarke London: Ballière Tindall. 1983. 8th edn. 448 pp. Price£ 19.50. WB Saunders; 1985.
2. Vesal N. Basics of Veterinary Anesthesia. 2nd, editor. shiraz: shiraz university; 1384. 59, 61 p (In Persian)
3. Klonner, M. E., S. Springer and C. Braun (2023). Complications secondary to endotracheal intubation in dogs and cats: A questionnaire-based survey among veterinary anaesthesiologists. Vet Anaesth Analg;50(3): 220-

- 229.doi:[10.1016/j.vaa.2023.02.007](https://doi.org/10.1016/j.vaa.2023.02.007)
PMID:37069018
4. [Barat](#) LF, [Bassi](#) GL, [Ferrer](#) M, [Bosch](#) A, [Calvo](#) M, [Vila](#) J, [Gabarrús](#) A, [Olondris](#) PM, [Rigol](#) M, [Esperatti](#) M, [Luque](#) N, [Torres](#) A. Direct analysis of bacterial viability in endotracheal tube biofilm from a pig model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia following antimicrobial therapy. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012;65(2): 309–317. doi:[10.1111/j.1574-695X.2012.00961.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00961.x) PMID:22444646
 5. Danin PE, Girou E, Legrand P, Louis B, Fodil R, Christov C, et al. Description and microbiology of endotracheal tube biofilm in mechanically ventilated subjects. Respir Care. 2015;60(1):21-9. doi:[10.4187/respcare.02722](https://doi.org/10.4187/respcare.02722) PMID:25371399
 6. Bauer T, Torres A, Ferrer R, Heyer C, Schultze-Werninghaus C, Rasche K. Biofilm formation in endotracheal tubes. Association between pneumonia and the persistence of pathogens. Monaldi Arch Chest Dis. 2002;57(1):84-7. PMID:12174708
 7. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. 2000;54(1):49-79. doi:[10.1146/annurev.micro.54.1.49](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49) PMID:11018124
 8. Pirrone M, Pinciroli R, Berra L. Microbiome, biofilms, and pneumonia in the ICU. Curr Opin Infect Dis. 2016;29(2):160-6. doi:[10.1097/QCO.0000000000000255](https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000255) PMID:26855081
 9. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. 2001;358(9276):135-8.
 10. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. science. 1999;284(5418):1318-22. doi:[10.1126/science.284.5418.1318](https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318) PMID:10334980
 11. Branda SS, Vik Å, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. Trends Microbiol. 2005;13(1):20-6. doi:[10.1016/j.tim.2004.11.006](https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006) PMID:15639628
 12. Jacques M, Aragon V, Tremblay YD. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. Anim Health Res Rev. 2010;11(2):97-121. doi:[10.1017/S1466252310000149](https://doi.org/10.1017/S1466252310000149) PMID:20969814
 13. Flanders SA, collard HR. Saints: nosocomial pneumonia: state of the science. Am J Infect Control. 2006; 34(84). doi:[10.1016/j.ajic.2005.07.003](https://doi.org/10.1016/j.ajic.2005.07.003) PMID:16490612
 14. Kollef MH. The prevention of ventilator associated pneumonia. N Engl J Med. 1999; 340: 627-634. doi:[10.1056/NEJM199902253400807](https://doi.org/10.1056/NEJM199902253400807) PMID:10029648
 15. Pan Y, Du L, Ai Q, Song S, Tang X, Zhu D, et al. Microbial investigations in throat swab and tracheal aspirate specimens are beneficial to predict the corresponding endotracheal tube biofilm flora among intubated neonates with ventilator-associated pneumonia. Exp Ther Med. 2017;14(2):1450-8. doi:[10.3892/etm.2017.4631](https://doi.org/10.3892/etm.2017.4631) PMID:28810610

16. Luis M MT, Janet T, Ellena M. Color atlas of medical bacteriology. united states of america 2004.
17. Markey BK CA, FC Leonard, D Maguire, M Archambaunt. clinical veterinary microbiology. edition s, editor. london new York: oxford Philadelphia.
18. CLSI. (2018). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA, USA.
19. CLSI VET. (2018). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 5th ed. CLSI VET01. Wayne, PA, USA.
20. Janecek DR, Welch M, O'Toole GA, O'Toole GA. HHQ, A precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) molecule, modulates 1 swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2011. doi:[10.1128/JB.05929-11](https://doi.org/10.1128/JB.05929-11) PMID:21965567
21. Longnecker DE, Murphy FL. Dripps, Eckenhoff, Vandam Introduction to Anesthesia: WB Saunders Philadelphia; 1997.
22. Stoelting RK, Miller RD. Basics of anesthesia: Churchill Livingstone New York; 2000.
23. Mortazavi Y, Nasiri E. Contamination of anesthetic machine with common method of disinfection in operation room. Res J Microbiol. 2006;1(6):546-9.
24. Sottile FD, Marrie TJ, Prough DS, Hobgood CD, Gower DJ, Webb LX, et al. Nosocomial pulmonary infection: possible etiologic significance of bacterial adhesion to endotracheal tubes. Crit Care Med. 1986;14(4):265-70. PMID:3956213
25. Bowers, P. R. (2002). Microbial growth on the anesthesia machine. AANA J;70(1): 53. PMID: 11887545
26. Arai LAdC, Azevedo RB. Contamination of anesthesia circuits by pathogens. Rev Bras Anesthesiol. 2011;61(1):54-9. doi:[10.1016/S0034-7094\(11\)70006-X](https://doi.org/10.1016/S0034-7094(11)70006-X) PMID:21334507
27. Duarte, D. F. L. S., A. S. Glória, A. C. Silva, A. M. Pinto, M. P. da Fonte and C. Dahlem (2023). Bacterial contamination of the anesthesia breathing machine: effectiveness of current infection control measures. Revista da Sociedade Portuguesa de Anestesiologia 32(2).
28. Boerlin P, Eugster S, Gaschen F, Straub R, Schawald P. Transmission of opportunistic pathogens in a veterinary teaching hospital. Vet Microbiol. 2001;82(4):347. doi:[10.1016/S0378-1135\(01\)00396-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00396-0) PMID:11506928
29. Van der Kolk, J. H., A. Endimiani, C. Graubner, V. Gerber and V. Perreten (2019). *Acinetobacter* in veterinary medicine, with an emphasis on *Acinetobacter baumannii*. J Glob Antimicrob Resist. 16: 59-71. doi:[10.1016/j.jgar.2018.08.011](https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.08.011) PMID:30144636
30. Vaneechoutte M, Devriese LA, Dijkshoorn L, Lamote B, Deprez P, Verschraegen G, et al. *Acinetobacter baumannii*-infected vascular catheters collected from horses in an equine clinic. J Clin Microbiol. 2000;38(11):4280-1. doi:[10.1128/JCM.38.11.4280-4281.2000](https://doi.org/10.1128/JCM.38.11.4280-4281.2000) PMID:11060112
31. Endimiani A, Hujer KM, Hujer AM, Bertschy I, Rossano A, Koch C, et al. *Acinetobacter baumannii* isolates from pets and horses in Switzerland: molecular characterization and clinical data. J Antimicrob Chemother.

- 2011;66(10):2248-54.
doi:[10.1093/jac/dkr289](https://doi.org/10.1093/jac/dkr289) PMID:21733964
32. Boerlin, P., S. Eugster, F. Gaschen, R. Straub and P. Schawalder (2001). Transmission of opportunistic pathogens in a veterinary teaching hospital. *Vet Microbiol.* **82**(4): 347-359. doi:[10.1016/s0378-1135\(01\)00396-0](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(01)00396-0) PMID:11506928
33. Smet A, Boyen F, Pasmans F, Butaye P, Martens A, Nemec A, et al. OXA-23-producing *Acinetobacter* species from horses: a public health hazard? *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(12):3009-10.
doi:[10.1093/jac/dks311](https://doi.org/10.1093/jac/dks311) PMID:22872446
34. Gil-Perotin S, Ramirez P, Marti V, Sahuquillo JM, Gonzalez E, Calleja I, et al. Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. *Crit Care.* 2012;16(3):R93. doi:[10.1186/cc11357](https://doi.org/10.1186/cc11357) PMID:22621676
35. Vandecandelaere, I., N. Matthijs, F. Van Nieuwerburgh, D. Deforce, P. Vosters, L. De Bus, H. J. Nelis, P. Depuydt and T. Coenye (2012). Assessment of microbial diversity in biofilms recovered from endotracheal tubes using culture dependent and independent approaches. *PLoS One.* **7**(6):38401. doi:[10.1371/journal.pone.0038401](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038401) PMID:22693635
36. Diaz-Blanco J, Clawson RC, Roberson SM, Sanders CB, Pramanik AK, Herbst JJ. Electron microscopic evaluation of bacterial adherence to polyvinyl chloride endotracheal tubes used in neonates. *Crit Care Med.* 1989;17(12):1335-40. doi:[10.1097/00003246-198912000-00019](https://doi.org/10.1097/00003246-198912000-00019) PMID:2591225
37. Inglis T, Millar M, Jones J, Robinson D. Tracheal tube biofilm as a source of bacterial colonization of the lung. *J Clin Microbiol.* 1989;27(9):2014-8. doi:[10.1128/jcm.27.9.2014-2018.1989](https://doi.org/10.1128/jcm.27.9.2014-2018.1989) PMID:2778064
38. de Oliveira Ferreira T, Koto RY, da Costa Leite GF, Klautau GB, Nigro S, da Silva CB, et al. Microbial investigation of biofilms recovered from endotracheal tubes using sonication in intensive care unit pediatric patients. *Braz J Infect Dis.* 2016;20(5):468-75. doi:[10.1016/j.bjid.2016.07.003](https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.07.003) PMID:27513530
39. Raveendra, N., S. H. Rathnakara, N. Haswani and V. Subramaniam (2022). Bacterial biofilms on tracheostomy tubes. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*;74(Suppl3):4995-4999. doi:[10.1007/s12070-021-02598-6](https://doi.org/10.1007/s12070-021-02598-6) PMID:33972925
40. Craven DE. Epidemiology of Ventilator – Associated pneumonia. *Chest.* 2000; 117:1865-187. doi:[10.1378/chest.117.4_suppl_2.186s](https://doi.org/10.1378/chest.117.4_suppl_2.186s) PMID:10816033
41. Otto M. *Staphylococcal* biofilms *Curr Top Microbiol Immunol*; 2008. p. 207-28. doi:[10.1007/978-3-540-75418-3_10](https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_10) PMID:18453278
42. Lee K, Yoon SS. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness. *J Microbiol Biotechnol.* 2017;27(6):1053-64. doi:[10.4014/jmb.1611.11056](https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11056) PMID:28301918
43. Arezo Saadatian farivar JN, Massoud Emami. Frequency of *Acinetobacter* in Surgical Care Unit of Rasool Akram Complex 2004. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences.* 2005;6. (In Persian)

-
44. Bou G, Oliver A, Martínez-Beltrán J. OXA-24, A novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(6):1556-61.
doi:[10.1128/AAC.44.6.1556-1561.2000](https://doi.org/10.1128/AAC.44.6.1556-1561.2000)
PMID:10817708
45. Wareth G, Neubauer H, Sprague LD. *Acinetobacter baumannii*—a neglected pathogen in veterinary and environmental health in Germany. Vet Res Commun. 2018;1-6.
doi:[10.1007/s11259-018-9742-0](https://doi.org/10.1007/s11259-018-9742-0)
PMID:30591981
46. Thorarinsdottir, H. R., T. Kander, A. Holmberg, S. Petronis and B. Klarin (2020). Biofilm formation on three different endotracheal tubes: a prospective clinical trial. Crit Care.24(1):1-12.
doi:[10.1186/s13054-020-03092-1](https://doi.org/10.1186/s13054-020-03092-1)
PMID:32600373
47. Percival SL, Knottenbelt DC, Cochrane CA. Biofilms and veterinary medicine: Springer Science & Business Media; 2011.

Abstracts in English

Isolation and Identification of Bacteria Forming Biofilms in Endotracheal Tubes of Small Animals

Reyhane Sangtarash ¹, Mehdi Askari Badouei ², Azam Mokhtari ³, Fatemeh Aflakian ⁴,
Ahmad Reza Mohammadnia ^{5*}

1. DVM graduate, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran

4. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

5. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

*mohamadnia@um.ac.ir

Background: Multiple factors play a role in the transmission of secondary infections to patients during surgery. Epidemiological studies have clearly demonstrated the role of anesthesia equipment in causing surgical infections.

Objectives: This study aimed to investigate the level of bacterial contamination of endotracheal tubes and anesthesia devices in small animals.

Methods: In this study, 15 endotracheal tubes and the connecting tube attached to the anesthesia apparatus, the canister wall, and the soda lime were examined. Samples taken from the last 5 cm of the endotracheal tube after removing the distal balloon (piece one) were cultured on MacConkey agar, chocolate agar, mannitol salt agar, and Stereimide agar. After bacterial culturing, the next 5 cm of the tube was cut (piece two), and each sample was cultured on chocolate agar for colony-forming unit (CFU) counting. The samples were incubated for 48 hours at 37 ° C. The ability of the isolated bacteria to produce biofilm was assessed by two methods: microscopic observation and microplate assay.

Results: In the direct bacterial culture method, 9 out of 15 endotracheal tubes showed growth, and in the overall colony count (CFU), bacterial growth was observed in 6 out of 15 samples. In the evaluation of biofilm production using the microscopic method, 7 out of 11 positive isolates were found, while the microplate method reported two positive samples, two weak samples, and 7 negative samples. The isolated bacteria included 4 cases of *Acinetobacter*, 2 cases of *Staphylococcus*, 2 cases of *Corynebacterium/Sphingomonas*, and one case each of *Klebsiella*, *Bacillus*, and *Alkaligenes*.

Conclusions: Based on the results of this study, anesthesia equipment can facilitate the transmission of microbial contamination to the respiratory tract. Since microbial biofilms are not eliminated by standard disinfection methods and play a significant role in antibiotic resistance, the presence of these contaminants in anesthesia equipment poses a serious risk to the health of animals in the surgical department.

Keywords: Anesthesia apparatus, Bacterial Contamination, Biofilm, Endotracheal tube, Small animals.