Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:20 +0430 on Monday April 23rd 2018

مقاله پژوهشی

تأثیر مهارکننده‌های پمپ افلاکس بر حداقل غلظت بازدارنده بنزالکونیوم کلراید و کلرهگزیدین در جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی جداشده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان غازی، آنکارا

شهره افشاریاوری*[1]، سیال روتا[2]، کایاهان چالار[3]، ایشیل فیدان[4]

تاریخ دریافت ۱۳۹۵/۰۱/۲۰ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۳/۲۵

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: مقاومت به عوامل ضد میکروبی در میان ایزوله‌های کلینیکی می‌تواند مشکلات درمانی بسیاری به همراه داشته باشد. پمپ‌های افلاکس نقش مهمی در دفع مواد سمی به خارج از سلول و ایجاد مقاومت دارند. یکی از این پمپ‌های ترشحی که در اسینتوباکتر بومانی شناخته شده است پمپ‌های AdeABC مربوط به خانواده RND می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی فنوتیپی عملکرد پمپ‌های افلاکس AdeABC در ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی نسبت به مواد ضدعفونی‌کننده بنزالکونیوم کلراید و کلر هگزیدین با استفاده از مهارکننده‌های فنیل الانیل- آرژینیل بتا نفتیل آمید (PAβN) و ۱-۱ نفتیل متیل- پیپرازین (NMP) بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۵۰ ایزوله اسینتوباکتر بومانی از بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان غازی آنکارا جمع‌آوری شد. پس از تأیید و تشخیص باکتری با روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی، حداقل غلظت بازدارنده (MIC) نسبت به بنزالکونیوم کلراید و کلرهگزیدین به روش میکرودایلوشن بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی بالینی (CLSI) سنجیده شد. سپس (MIC) در کنار ممانعت کننده‌های پمپ‌های افلاکس (PAβN) و (NMP) تعیین شد.

یافته‌ها: پمپ‌های افلاکس AdeABC می‌توانند در کاهش حداقل غلظت بازدارنده نسبت به بنزالکونیوم کلراید و کلرهگزیدین در جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی نقش داشته باشد.

کلیدواژه‌ها: اسینتو باکتر بومانی، مهارکننده‌های پمپ افلاکس، فنیل الانیل- آرژینیل بتا نفتیل آمید، ۱-۱ نفتیل متیل- پیپرازین، بنزالکونیوم کلراید، کلرهگزیدین

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره پنجم، ص ۴۰۱-۳۹۳، مرداد ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: کیلومتر ۱۱ جاده نازلو، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه تلفن: ۰۴۴۳۲۷۵۲۳۰۰

Email: shafsharyavari@yahoo.com

مقدمه

اسینتوباکتر بومانی یک باکتری گرم منفی غیر متحرک بوده و می‌تواند در افراد مستعد عفونت‌های شدید ایجاد نماید (۱). جدایه‌های اسینتو باکتر بومانی با مقاومت چندگانه مشکلات بسیار زیادی در درمان و عفونت‌های بیمارستانی ایجاد نموده است (۲). استفاده از ضدعفونی‌کننده‌ها برای تأمین سلامتی بسیار ضروری است و از عوامل مهم پیشگیری از بیماری‌ها بخصوص، بیماری‌های مسری می‌باشد.

برای ضدعفونی کردن سطوح و جلوگیری از گسترش عفونت از آنتی‌سپتیک و دزنفکتانت‌ها در مراکز بهداشتی به‌طور گسترده استفاده می‌شود (۳) ازجمله بنزالکونیوم کلراید که می‌تواند از فعالیت بعضی از آنزیم‌های حیاتی باکتری‌ها جلوگیری کرده و همچنین باعث آزاد شدن محتویات داخل سلول باکتری به محیط اطراف گردد و کلرهگزیدین که از طریق تخریب دیواره سلولی باعث مرگ باکتری‌ها می‌شوند (۴، ۵).

کاربرد وسیع این مواد سبب ایجاد افزایش مقاومت میکروبی

[1] استادیار میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (نویسنده مسئول)

[2] استاد میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه غازی

[3] دانشیارمیکروب شناسی پزشکی، دانشگاه غازی

[4] دانشیار میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه غازی

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:20 +0430 on Monday April 23rd 2018

به‌ویژه مقاومت متقابل به آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. مکانیسم‌های مختلفی باعث مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی (آنتی‌سپتیک‌ها و دزنفکتانت‌ها) می‌گردد ولی متأسفانه خیلی کم‌تر از آنتی‌بیوتیک‌ها موردتوجه و مطالعه قرار گرفته است (۶).

سیستم‌های افلاکس به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت ذاتی و اکتسابی در باکتری‌ها به حساب آمده و توانایی دفع مواد سمی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، داروها، مواد شیمیایی و همچنین ترشح فرآورده‌های سلولی را به خارج از سلول دارند. پمپ‌های افلاکس مانع از ایجاد غلظت مناسبی از مواد سمی برای مهار باکتری‌ها شده و به‌عنوان مکانیسم دفاعی علیه مواد مضر محیط سبب بقا باکتری در محیط‌های مختلف می‌شود (۷-۹).

پمپ‌های افلاکس در باکتری‌ها از ۵ خانواده بزرگ تشکیل شده است. از بین آن‌ها خانواده RND[1] جزو پمپ‌های افلاکس چند دارویی بوده و جهت جابه‌جایی سوبسترا از انرژیATP استفاده می‌کنند (۸، ۷). این خانواده با توجه به ساختار با بقیه متفاوت بوده و فقط در باکتری‌های گرم منفی یافت می‌شوند. دارای ناقل‌های بزرگ بوده و بازدهی این ناقل‌ها به‌دلیل اینکه سوبسترا را مستقیماً به محیط خارج پمپ می‌کنند بیشتر از سایر ناقل‌ها می‌باشد. AdeABC یکی از مهم‌ترین سیستم‌های افلاکس متعلق به خانواده RND است و سه ژن AdeB، AdeA و AdeC آن را کد می‌کنند (۱۰). AdeB یک پروتئین ترانسپورتر، AdeA یک پروتئین فیوژن غشایی و AdeC یک پروتئین غشا خارجی می‌باشد. آنتی‌بیوتیک و مواد شیمیایی بسیاری به‌عنوان سوبسترا می‌توانند بیان ژن‌های AdeABC را افزایش داده و به مقاومت‌های مختلف منجر شوند (۱، ۱۱).

برای مقابله با پمپ‌های افلاکس دارویی می‌توان از مهارکننده‌های افلاکس استفاده کرد (۱۲). مهارکننده‌های مختلفی جهت مقابله با افلاکس‌های مختلف گزارش شده است ازجمله فنیل الانیل- آرژینیل بتا نفتیل آمید (PAβN) با فرمول C25H30N6O2 که یکی از اولین مهارکننده‌های پمپ‌های RND در باکتری‌های گرم منفی بوده و بر AdeABC اثر می‌گذارد. ۱-۱ نفتیل متیل- پیپرازین (NMP) با فرمول C15H18N2 مهارکننده دیگری است که با تأثیر برپمپ AdeABC می‌تواند با دفع مواد سمی حداقل غلظت بازدارنده آن‌ها را تغییر دهد (۱۳، ۱۴).

پمپ‌های افلاکس با دفع آنتی‌بیوتیک، داروها و مواد شیمیایی باعث افزایش حداقل غلظت بازدارنده این مواد شده و با کاهش غلظت دارو در درون سلول سبب ایجاد سویه‌های موتانت مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، داروها و مواد شیمیایی می‌شوند. پمپ‌های افلاکس تنوع وسیعی در شناسایی سوبستراهای مختلف داشته و این مسئله باعث مقاومت‌های دارویی مختلف در باکتری‌ها می‌شود. همچنین اثر هم‌افزایی آن‌ها با مکانیسم‌های دیگر مقاومت‌های دارویی بسیار حائز اهمیت بوده و لازم است مانند سایر مکانیسم‌های مقاومت راهکارهای مقابله با آن‌ها بررسی شود (۱۵، ۱۶).

مطالعات نشان می‌دهد که با مختل کردن پمپ‌های افلوکس در سویه‌های بسیار مقاوم باکتری‌ها توسط مهارکننده‌های افلوکس، خاصیت ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک‌ها و بیوسایدها به مقادیر قابل توجهی افزایش می‌یابد (۱۷،۱۸) بنابراین پمپ‌های افلوکس باکتریایی نقش مهمی در تضعیف خاصیت ضدمیکروبی آنتی‌بیوتیک‌ها و بیوسایدها می‌تواند داشته باشد. مطالعات در مورد بیوسایدها محدودتر بوده و مقالات کم‌تری در دسترس می‌باشد (۱۹).

هدف از این مطالعه بررسی فنوتیپی حضور پمپ‌های افلاکس AdeABC در ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی نسبت به مواد ضدعفونی‌کننده بنزالکونیوم کلراید و کلر هگزیدین با استفاده از مهارکننده‌های فنیل الانیل- آرژینیل بتا نفتیل آمید (PAβN) و ۱-۱ نفتیل متیل- پیپرازین (NMP) بود و آیا با مهار فعالیت این پمپ‌ها می‌توان عملکرد بالینی مواد ضد میکروبی را بهبود بخشید و بدین طریق امید داشت که مهارکننده‌های افلوکس نیز همانند آنتی‌بیوتیک‌ها به زمینه درمان بالینی و بهداشت راه یابند.

مواد و روش کار

جداسازی و تشخیص نمونه‌ها:

در این مطالعه توصیفی- تحلیلی تعداد ۵۰ جدایه اسینتوباکتر بومانی از بیماران بخش‌های مراقبت‌های ویژه بیمارستان غازی آنکارا بین سال‌های ۲۰۱۰-۲۰۱۱ جداسازی و تعیین هویت گردید. جنس و گونه باکتری با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی استاندارد باکتری‌شناسی شامل رشد بر روی محیط مک کانکی در ۴۲ درجه سانتی‌گراد، رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز، حرکت، OF، واکنش روی محیط TSI و در صورت لزوم با کیت‌های تشخیصی (API ID 32 bioMerieux, France) تعیین هویت گردید (۲۰). سپس حداقل غلظت بازدارنده نسبت به کلرهگزیدین و بنزالکونیوم کلراید به‌تنهایی و همراه با ممانعت کننده‌های افلاکس به روش میکرودایلوشن بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی بالینی (CLSI) سنجیده شد (۲۱).

آماده‌سازی محیط‌های کشت:

[1] Resistance- Nodulation- Division

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:20 +0430 on Monday April 23rd 2018

محیط کشت مولر هینتون براث (MHB TM Difco) طبق دستورالعمل شرکت دارویی در ۳ ارلن مجزا تهیه گردید. برای تهیه محیط کشت حاوی ممانعت کننده‌های افلاکس محلولPAβN با فرمول C25H30N6O2.2HCL-(Sigma-Aldrich) (۱۰۰ میلی‌گرم/ ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر) و ۱-۱ نفتیل متیل- پیپرازین (NMP) با فرمول C15H18N2-(Sigma) (۱۰۰ میلی‌گرم/ ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفولینت DMSO-(Merck)) آماده شد. به یکی از ارلن‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون براث سرد شده ۱۰۰mg/lt محلول PAβN و به ارلن دیگر ۱۰۰mg/lt محلول NMP اضافه گردید (۱۴). هر یک از محیط‌های کشت به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در داخل چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ تایی انتها گرد استریل به‌طور جداگانه ریخته شد.

تهیه رقت‌های بنزالکونیوم کلراید و کلرهگزیدین:

برای تهیه رقت‌های سریال از بنزالکونیوم کلراید(Sigam - $C_6H_5CH_2N(CH_3)_2RCl$) ۰/۵۱۲ میلی‌گرم از پودر در cc10 آب مقطر حل گردید و سپس به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد. غلظت مادر از این ماده ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. سپس رقت‌های سریالی در مقادیر ۱۲۸ µg/lt<-۰/۵> در داخل چاهک‌های میکروپلیت تهیه شد. برای تهیه رقت‌های سریال از کلروهگزیدین- ($C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ Sigma)) ۹۶۶ میکرولیتر در ۳۴ میکرولیتر آب مقطر حل گردید. سپس به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ رقیق‌شده و غلظت ۱۰۲۴ میکروگرم بر لیتر به‌دست آمد (۲۱). سپس رقت‌های سریالی در مقادیر ۲۵۶<- ۱> در چاهک‌های میکروپلیت تهیه شد.

تهیه میزان تلقیح باکتری:

به‌منظور دستیابی به کشت تازه و فعال از باکتری‌های موردمطالعه، باکتری از محیط کشت ذخیره به محیط تریپتیکس سوی آگار (TSA Difco) منتقل شد و در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت گرمخانه گذاری شد. از کشت جدید باکتری غلظت معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه‌شده (CFU/ml 1x108) و توسط اسپکتوفتومتر در طول‌موج 625nm تأیید گردید. سپس به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق کرده ($1x10^6$ CFU/ml) با اضافه کردن ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به هر یک از چاهک‌های میکروپلیت حاوی 100 میکرولیتر محیط کشت غلظتی معادل ($5x10^5$ CFU/ml) به‌دست آمد (۲۱). یک لاین به‌عنوان کنترل منفی که درواقع محلول آنتی‌بیوتیک به همراه محیط مولر هینتون براث می‌باشد و یک لاین دیگر به‌عنوان کنترل مثبت که درواقع E.coliATCC25922 می‌باشد، در نظر گرفته شد. کم‌ترین غلظت بازدارنده که در حضور آن رشدی صورت نگرفت به‌عنوان MIC مشخص شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، تعداد ۵۰ ایزوله کلینیکی اسینتوباکتربومانی از بیماران بستری در ICU بیمارستان غازی آنکارا جمع‌آوری و توسط تست‌های استاندارد باکتری‌شناسی مورد شناسایی قرار گرفت. نمونه‌های ارسالی آسپیراسیون ریه (۳۲ درصد)، خلط (۱۴ درصد)، زخم (۱۴ درصد)، برونشیال لاواژ (۱۲ درصد)، خون (۱۰ درصد)، کاتتر خونی (۸ درصد)، مایع مغزی نخاعی (۶ درصد)، ادرار (۲ درصد) و مایع پلور (۲ درصد) بودند. تمامی نمونه‌ها از افراد بستری در ICU شامل ۵۲ درصد زن و ۴۸ درصد مرد با میانگین سنی در بالغین ۶۰/۷۲ (۸۶-۱۵) و میانگین سنی در کودکان ۲/۸۴ (۱۴-۱) به‌دست آمد.

نتایج تست حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) در ۵۰ جدایه اسینتوباکتر بومانی نسبت به بنزالکونیوم کلراید و کلرهگزیدین با حضور و بدون حضور پمپ‌های افلاکس در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است. در این مطالعه مقدار MIC در بنزالکونیوم کلراید بین µg/ml ۶۴ - ۸ و مقدار MIC ۶۴ درصد از جدایه‌ها برابر با µg/ml ۱۶ و ۲۶ درصد برابر با µg/ml ۳۲ بود. مقدار MIC در کلرهگزیدین بین µg/ml ۱۲۸-۱۶ و MIC ۴۶ درصد از جدایه‌ها برابر با µg/ml ۳۲ و ۴۲ درصد برابر با µg/ml ۶۴ بوده است.

مقدار MIC در بنزالکونیوم کلراید به همراه PAβN بین µg/ml ۱۶ - ۲ و مقدار MIC ۳۸ درصد از جدایه‌ها برابر با µg/ml ۴ و ۳۸ درصد برابر با µg/ml ۸ بود. مقدار MIC در بنزالکونیوم کلراید به همراه NMP بین ۱۶µg/m - ۲ و مقدار MIC ۵۲ درصد از جدایه‌ها برابر باµg/ml ۴ و ۳۰ درصد µg/ml ۸ بود.

مقدار MIC در کلرهگزیدین به همراه PAβN بین µg/ml ۶۴ - ۴ و مقدار MIC ۲۶ درصد از جدایه‌ها برابر با µg/ml ۸، ۳۶ درصد برابر با µg/ml ۱۶ بود. مقدار MIC در بنزالکونیوم کلراید به همراه NMP بین ۶۴µg/m - ۲ و مقدار MIC ۳۲ درصد از جدایه‌ها برابر با µg/ml ۸ و ۲۸ درصد برابر با µg/ml ۱۶ بود.

همان‌طوری که در جدول ۳ و ۴ نشان داده شده است در ۹۴-۸۸ درصد از جدایه‌ها حداقل غلظت بازدارنده بنزالکونیوم کلراید و کلرهگزیدین در کنار ممانعت‌کننده‌های افلاکس ۸-۲ برابر کاهش‌یافته و در ۱۲-۶ درصد از جدایه‌ها تغییری دیده نشده است.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:20 +0430 on Monday April 23rd 2018

جدول (۱): نتایج حداقل غلظت مهارکننده از رشد در ۵۰ جدایه اسینتوباکتر بومانی نسبت به کلرهگزیدین و بنزالکونیوم کلراید

MIC (µg/ml)	بنزالکونیوم کلراید (٪)	کلرهگزیدین (٪)
۲۵۶ (µg/ml)	-	-
۱۲۸ (µg/ml)	-	۳ (%۶)
۶۴ (µg/ml)	۱ (%۲)	۲۱ (%۴۲)
۳۲ (µg/ml)	۱۳ (%۲۶)	۲۳ (%۴۶)
۱۶ (µg/ml)	۳۲ (%۶۴)	۳ (%۶)
۸ (µg/ml)	۴ (%۸)	-
جمع	۵۰ (%۱۰۰)	۵۰ (%۱۰۰)

جدول (۲): نتایج حداقل غلظت مهارکننده از رشد در ۵۰ جدایه اسینتوباکتر بومانی نسبت به کلرهگزیدین و بنزالکونیوم کلراید به همراه ممانعت کننده‌های افلاکس

MIC (µg/ml)	NMP (٪) بنزالکونیوم کلراید+	PaβN+ (٪) بنزالکونیوم کلراید	NMP (٪) کلرهگزیدین +	PaβN+ (٪) کلرهگزیدین
۶۴ (µg/ml)	-	-	۱ (%۲)	۲ (%۴)
۳۲ (µg/ml)	-	-	۱۱ (%۲۲)	۱۲ (%۲۴)
۱۶ (µg/ml)	۶ (%۱۲)	۸ (%۱۶)	۱۴ (%۲۸)	۱۸ (%۳۶)
۸ (µg/ml)	۱۵ (%۳۰)	۱۹ (%۳۸)	۱۶ ((%۳۲)	۱۳ (%۲۶)
۴ (µg/ml)	۲۶ (%۵۲)	۱۹ (%۳۸)	۵ (٪۱۰)	۵ (٪۱۰)
۲ (µg/ml)	۳ (% ۶)	۴ (%۸)	۳ (%۶)	-
جمع	۵۰ (%۱۰۰)	۵۰ (%۱۰۰)	۵۰ (%۱۰۰)	۵۰ (%۱۰۰)

جدول (۳): اثر فنیل الانیل- آرژینیل بتا نفتیل آمید (PAβN) و ۱-۱ نفتیل متیل- پیپرازین (NMP) بر حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد بنزالکونیوم در جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی

تعداد باکتری	بنزالکونیوم کلراید (MIC) µg/ml	بنزالکونیوم کلراید+ NMP (MIC) µg/ml	مقدار کاهش MIC	تعداد باکتری	بنزالکونیوم کلراید (MIC) µg/ml	بنزالکونیوم کلراید+ PAβN (MIC) µg/ml	مقدار کاهش MIC
۱	۶۴	۱۶	(۴ برابر)	۱	۶۴	۱۶	(۴ برابر)
۲	۳۲	۱۶	(۲ برابر)	۵	۳۲	۱۶	(۲ برابر)
۷	۳۲	۸	(۴ برابر)	۵	۳۲	۸	(۴ برابر)
۴	۳۲	۴	(۸ برابر)	۳	۳۲	۴	(۸ برابر)
۳	۱۶	۱۶	(۰)	۲	۱۶	۱۶	(۰)
۷	۱۶	۸	(۲ برابر)	۱۳	۱۶	۸	(۲ برابر)
۱۹	۱۶	۴	(۴ برابر)	۱۳	۱۶	۴	(۴ برابر)
۳	۱۶	۲	(۸ برابر)	۴	۱۶	۲	(۸ برابر)
۱	۸	۸	(۰)	۱	۸	۸	(۰)
۳	۸	۴	(۲ برابر)	۳	۸	۴	(۲ برابر)

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:20 +0430 on Monday April 23rd 2018

جدول (۴): اثر فنیل الانیل- آرژینیل بتا نفتیل آمید (PAβN) و ۱-۱ نفتیل متیل- پیپرازین (NMP) بر حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد کلرهگزیدین در جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی

تعداد باکتری	کلرهگزیدین (MIC) µg/ml	کلرهگزیدین+ NMP (MIC) µg/ml	مقدار کاهش MIC	تعداد باکتری	کلرهگزیدین (MIC) µg/ml	کلرهگزیدین+ PAβN (MIC) µg/ml	مقدار کاهش MIC
۳	۱۲۸	۳۲	(۴ برابر)	۱	۱۲۸	۳۲	(۴ برابر)
-	۱۲۸	-	-	۲	۱۲۸	۱۶	(۸ برابر)
۱	۶۴	۶۴	(۰)	۲	۶۴	۶۴	(۰)
۵	۶۴	۳۲	(۲ برابر)	۸	۶۴	۳۲	(۲ برابر)
۱۰	۶۴	۱۶	(۴ برابر)	۸	۶۴	۱۶	(۴ برابر)
۵	۶۴	۸	(۸ برابر)	۳	۶۴	۸	(۸ برابر)
۳	۳۲	۳۲	(۰)	۳	۳۲	۳۲	(۰)
۴	۳۲	۱۶	(۲ برابر)	۷	۳۲	۱۶	(۲ برابر)
۹	۳۲	۸	(۴ برابر)	۸	۳۲	۸	(۴ برابر)
۴	۳۲	۴	(۸ برابر)	۵	۳۲	۴	(۸ برابر)
۳	۳۲	۲	(۱۶ برابر)	۱	۱۶	۱۶	(۰)
۲	۱۶	۸	(۲ برابر)	۲	۱۶	۸	(۲ برابر)
۱	۱۶	۴	(۴ برابر)	-	-	-	-

بحث و نتیجه‌گیری

تشخیص و جلوگیری از گسترش باکتری‌های مقاوم باعث کاهش استفاده از داروها و مواد ضدعفونی‌کننده مختلف می‌شود. شناسایی مکانیسم‌های مقاومت در باکتری‌ها یکی از راه‌های مقابله با باکتری‌های پاتوژن بوده و در کنترل عفونت در مراکز بهداشتی درمانی و انتشار بیماری‌ها و کاهش میزان مرگ‌ومیر مؤثر است (۳).

از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت می‌توان به پمپ‌های ترشحی افلاکس اشاره نمود. سیستم‌های دفع دارویی اهمیت زیادی در ایجاد مقاومت‌های دارویی داشته و لازم است راهکار مناسبی برای مقابله با آن‌ها یافته شود. یکی از این راهکارها استفاده از ممانعت کننده‌های پمپ‌های افلاکس به همراه مواد شیمیایی و داروها می‌باشد. در این تحقیق حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی جداشده از بخش‌های مراقبت‌های ویژه بیمارستان غازی نسبت به بنزالکونیوم کلراید و کلرهگزیدین به‌تنهایی و همراه با ممانعت کننده پمپ‌های افلاکس RND به‌طور جداگانه به روش میکرو دایلوشن انجام گرفت.

نتایج نشان می‌دهد ۹۴-۸۸ درصد از جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی، بنزالکونیوم کلراید و کلرهگزیدین را توسط پمپ‌های افلاکس RND به بیرون تخلیه کرده و باعث کاهش غلظت دارو (حداقل ۲ الی ۸ برابر) در داخل سلول می‌شوند. حداقل غلظت بازدارنده از رشد در ۶۸-۶۴ درصد از جدایه‌ها با ممانعت کننده NMP و در ۵۴-۵۲ درصد از جدایه‌ها با ممانعت کننده PAβN، حداقل ۸-۴ برابر کاهش یافته است.

مطالعات مختلفی در زمینه اثر مهارکننده‌های افلوکس و تأثیر آن‌ها بر افزایش حداقل غلظت بازدارنده آنتی‌بیوتیک‌های مختلف انجام یافته است Pannek در سال ۲۰۰۶ در آلمان، Peleg در سال ۲۰۰۷ در آمریکا، Vecchione در سال ۲۰۰۹ در آمریکا، Li در سال ۲۰۱۱ در چین بر افزایش خاصیت ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در کنار مهارکننده‌های افلوکس تأکید داشته است (۱۴، ۲۴-۲۲).

Rajamohan در سال ۲۰۱۰ در آمریکا مطالعه‌ای بر روی ۵۰ اسینتو باکتر بومانی انجام داد و مقدار MIC بیوساید بنزالکونیوم کلراید را بین ۱۲۰-۱۵ µg/ml و مقدار MIC بیوساید کلرهگزیدین را بین ۱۰۰-۱۶ µg/ml گزارش نموده است. آن‌ها با استفاده از مهارکننده‌های افلاکس مقدار MIC بنزالکونیوم کلراید را ۳ برابر و مقدار MIC کلرهگزیدین را ۵ برابر کاهش دادند (۲۵).

در مطالعه ایی که Mervi در سال ۲۰۱۲ در اسلووانیا انجام داده نشان می‌دهد که با مختل کردن پمپ‌های افلوکس در سویه‌های مقاوم کمپیلوباکتر ژژونی و کلی توسط مهارکننده‌های افلوکس، خاصیت ضدمیکروبی آنتی‌بیوتیک‌ها و بیوسایدها به مقادیر

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:20 +0430 on Monday April 23rd 2018

قابل‌توجهی افزایش‌یافته و اثر مهارکنندگی PAβN کم‌تر از NMP می‌باشد (۱۹).

در مطالعه‌ای که Winfried در سال ۲۰۰۶ در آلمان بر روی ۱۶۷ باکتری از خانواده انترو باکتریاسیه انجام داده است، مقدار MIC مواد ضد میکروبی مختلف در کنار مهارکننده‌های پمپ افلاکس از نوع RND، ۴ برابر کاهش یافته است (۲۶).

در مطالعه Sonnet مهارکننده PAβN در کاهش MIC آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل سیپروفلوکساسین در سودوموناس آئروژینوزا تأثیر داشته ولی مهارکننده NMP تأثیری بر کاهش حداقل غلظت بازدارنده این آنتی‌بیوتیک نداشته است. او معتقد است برای استفاده بالینی از مهارکننده افلوکس با تأثیر بالا باید ترکیبی از مهارکننده‌ها تهیه و اثر آن‌ها بر روی پمپ‌های مختلف بررسی گردد (۱۸).

Dal در سال ۲۰۱۴ در ترکیه اثر مهارکننده‌های PAβN و NMP را بر روی ژن Ade B در ۴۰ جدایه اسینتو باکتر بومانی و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف موردبررسی قرار داد و ملاحظه کرد خاصیت ضدمیکروبی برخی آنتی‌بیوتیک‌ها همراه با مهارکننده افلوکس به مقادیر قابل‌توجهی افزایش‌یافته ولی در آمینوگلیکوزیدها تغییری چشمگیری ملاحظه نمی‌شود تأثیر مهارکننده NMP در افزایش خاصیت ضد میکروبی کینولون‌ها را بیشتر از PAβN گزارش کرده است (۲۷).

Russell عقیده دارد که افزایش مقدار MIC مواد ضدعفونی‌کننده مانند بنزالکونیوم کلراید و کلر هگزیدین به علت استفاده در غلظت‌های بالا مشکلی ازنظر ضدعفونی سطوح مختلف ایجاد نمی‌کند. مسئله مهم اثر هم‌افزایی آن‌ها با مکانیسم‌های دیگر مقاومت‌های دارویی است و این موضوع می‌تواند در ایجاد باکتری‌های موتانت مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها نقش بسیار مهمی داشته باشد (۲۸).

مطالعه فنوتیپی بیان سیستم افلاکس با استفاده از ممانعت کننده‌های آن و کاهش MIC باکتری‌ها در بنزالکونیوم کلراید و کلرهگزیدین در این مطالعه نشان‌دهنده حضور پمپ‌های افلاکس از نوع RND می‌باشد. در مطالعات مشابه استفاده از مهارکننده‌های پمپ افلوکس تأثیر زیادی در حداقل غلظت بازدارنده عوامل ضد میکروبی داشته و در برخی موارد تغییرات چشمگیر نبوده است. توضیح این است که مکانیسم‌های مقاومت داروئی مختلفی در باکتری‌ها وجود داشته و پمپ‌های افلوکس یکی از این مکانیسم‌ها می‌باشد. پمپ‌های ترشحی می‌تواند نقش مهمی در کاهش حساسیت به مواد ضدعفونی‌کننده داشته باشد ولی نقش سایر عوامل و مکانیسم‌های مقاومت نباید فراموش گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی است از پایان‌نامه دکتری شهره افشار یاوری با عنوان" بررسی ژن‌های افلوکس پمپ ADEB, ADEJ,QAC در مقاومت اسینتوباکتر بومانی نسبت به بیوسایدها در مقطع دکترای تخصصی در سال ۲۰۱۲ بوده و با کد SBE- 11/2003-1 از طرف دانشگاه غازی ترکیه حمایت و اجرا شده است.

References:

1. Curtis LT. Prevention of hospital acquired infections: review of non-pharmacological Intervention. J Hosp Infect 2008; 69(3): 204-19.
2. Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis IA.The diversity of definitions of multidrug resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa. J Med Microbiol 2006;55(12): 1619-29.
3. Rutala AW, Weber DJ. Disinfection, Sterilization and Control of Hospital Waste. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds.Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia: Elsevier; 2005. P.3331-47.
4. Hegstad K, Langsrud S, Tore Lunestad B, Scheie, Marianne Sunde AA, Yazdankhah SP. Does the Wide Use of Quaternary Ammonium Compounds Enhance the Selection and Spread of Antimicrobial Resistance and Thus Threaten Our Health? Microbial Drug Resistance 2010; 16(2): 91-104.
5. Russell A D, Day M J. Antibacterial activity of chlorohexidin. J hospital infection 1993; 25: 229-38.
6. Chapman JS. Biocide resistance mechanisms. Int Biodeterior Biodegrad 2003;51(2):133–138.
7. Schneiders T, Findlay J, Amyes SG. Efflux Pumps in Acinetobacter baumannii. Acinetobacter Biology and Pathogenesis Springer; 2008. p. 105–27.
8. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother 2005; 56(1): 20-51.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:20 +0430 on Monday April 23rd 2018

9. Poole K. Mechanism of bacterial biocide and antibiotic resistance. J Appl Microbiol 2002; 92: 55-64.
10. Peerayeh SH.N, Esmaeili D. Antibiotic Efflux Pumps. JAUMA 2004;5(2): 301-6.
11. Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zórawski M, Krawczyk M,Tryniszewska E. Multidrug resistant Acinetobacter baumannii - the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. Folia Histochemica et Cytobiologica 2008; 46 (3): 257-67.
12. Lomovskaya O, Bostian KA. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic. A vision for applied use. Biochem Pharmacol 2006; 71: 910–8.
13. Winfried VK, Steinke P, Schumacher A, Schuster S et al. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of Escherichia coli. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 339–43.
14. Pannek S, Higgins PG, Steinke P, Jonas D, Akova M, Bohnert JA. Multidrug efflux inhibition in Acinetobacter baumannii comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-β-naphthylamide. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 970-4.
15. Chapman JS. Disinfectant resisitance mechanisms, cross-resistance and co-resistance. Int Biodeterior Biodegradation 2003;51: 271-6.
16. Tandukar M, Oh S, Tezel U, Konstantinidis K, Pavlostathis S. Long-Term Exposure to Benzalkonium Chloride Disinfectants Results in Change of Microbial Community Structure and Increased Antimicrobial Resistance. Environ Sci Technol 2013; 47: 9730−8.
17. Barrero MAO, Pietralonga P a. G, Schwarz DGG, Silva A, Paula SO, Moreira M a. S. Effect of the inhibitors phenylalanine arginyl ß-naphthylamide (PAßN) and 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) on expression of genes in multidrug efflux systems of Escherichia coli isolates from bovine mastitis. Res Vet Sci 2014;97(2):176–81.
18. Sonnet P, Izard D, Mullié C. Prevalence of efflux-mediated ciprofloxacin and levofloxacin resistance in recent clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa and its reversal by the efflux pump inhibitors 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenylalanine-arginine-_-naphthylamide. Int J Antimicrobial Agents 2012; 39: 77– 80.
19. Mavri A. Mozˇina S.S. Involvement of efflux mechanisms in biocide resistance of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. J Med Microbiol 2012; 61: 800–8.
20. Koneman EW. Color atlas textbook of diagnostic microbiology.4th ed. New York: Lippincott Company; 1992. P. 67-110.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement.M100-S222012. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
22. Peleg AY, Adams J, Paterson DL. Tigecycline Efflux as a Mechanism for Nonsusceptibility in Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother 2007;51(6):2065–9.
23. Vecchione JJ, Alexander B, Sello JK. Two distinct major facilitator superfamily drug efflux pumps mediate chloramphenicol resistance in Streptomyces coelicolor. Antimicrob Agents Chemother 2009;53(11):4673–7.
24. Li L, Li Z, Guo N, Jin J, Du R, Liang J, et al. Synergistic activity of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine with ciprofloxacin against clinically resistant Staphylococcus aureus, as determined by different methods. Lett Appl Microbiol 2011;52(4):372–8.
25. Rajamohan G, Srinivasan V B, Gebreyes W A. Novel role of Acinetobacter baumannii RND efflux

transporters in mediating decreased susceptibility to biocides. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 228–32.

26. Winfried VK, Steinke P, Schumacher A, Schuster S et al. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of Escherichia coli. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 339–43.

27. Dal T, Aksu B, Page`s J.M and Over-Hasdemir U. Expression of the adeB gene and responsiveness to 1 (1-naphthylmethyl)-piperazine and phenylalanyl arginylb- naphthylamide in clinical isolates of Acinetobacter baumannii. J Antimicrob Chemother 2013; 1-3.

28. Russell AD, Suller TE, Maillard JY. Do antiseptics and disinfectants select for antibiotic resistance? J Med Microbiol 1999; 48: 613-5.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:20 +0430 on Monday April 23rd 2018

Original Article

EFFLUX PUMP INHIBITORS EFFECT ON THE MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION OF BENZALKONIUM CHLORIDE AND CHLORHEXIDINE IN *ACINETOBACTER BAUMANNII* STRAINS ISOLATED FROM HOSPITALIZED INPATIENTS IN GAZI HOSPITAL, ANKARA

Shohreh Afshar Yavari*[1], Seyyal Rota[2], Kayahan Caglar[3], Isıl Fidan[4]

Received: 9 Apr, 2016; Accepted: 15 June, 2016

Abstract

***Background & Aims*:** Today, increasing resistance to antibiotics causes serious problems for treatment of patients. The aim of this study was to determine the role of AdeABC efflux pump in the Benzalkonium chloride and Chlorhexidine MIC value with efflux pump inhibitors (1-1-naphthylmethyl-piperazine and phenyl-arginine-β-naphthylamide) in the A.baumanii strains isolated from intensive care unit.

***Materials & Methods*:** This study was conducted on 50 isolates of Acinetobacter baumannii collected from ICU wards of Gazi hospital. The species identification was performed by standard laboratory methods. Benzalkonium chloride and Chlorhexidine MIC value were performed using microdilution method according to the clinical and laboratory standards institute (CLSI) guidelines. The activity of the efflux pump was evaluated using the efflux pump inhibitors.

***Conclusions*:** The AdeABC efflux pump may play a role in decreasing Benzalkonium chloride and Chlorhexidine MIC value in A. baumannii isolates.

***Keywords*:** Acinetobacter baumannii, Efflux pump inhibitors, 1-1-naphthylmethyl-piperazine, Phenyl-arginine-β-naphthylamide, Benzalkonium chloride, Chlorhexidine

Address: Faculty of Paramedical Science, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
Tel: (+98) 4432752300
Email: shafsharyavari@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2016: 27(5): 401 ISSN: 1027-3727

[1] *Assistant Professor, Department of Laboratory Sciences, Faculty of Paramedical Sciences , Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding Author)*
[2] *Professor, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Gazi University, Ankara, Turkey*
[3] *Associate Professor, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Gazi University, Ankara, Turkey*
[4] *Associate Professor, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Gazi University, Ankara, Turkey*

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:20 +0430 on Monday April 23rd 2018