

ارزیابی اثر کلرهگزیدین و EDTA بر سویه‌های مقاوم به چند دارو کلبسیلا پنومونیه و اشریشیا کلی تولیدکننده بیوفیلیم

شایان صفوی^۱، ملیکا پیمان گهر^۲، محدثه خاکپور^۳، فاطمه فرد صانعی^۴، فرهاد نیکخواهی^{۵*}

تاریخ دریافت ۱۴۰۳/۰۵/۰۳ تاریخ پذیرش ۱۴۰۳/۰۷/۲۱

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه باکتری‌های مهم ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی هستند که با کسب پلاسمیدهای کدکننده بتالاکتامازها به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مقاوم شده‌اند. مقاومت به مواد ضدعفونی‌کننده در این سویه‌ها نیز مشاهده شده است. بنابراین هدف انجام این مطالعه بررسی اثر ضد میکروبی ماده ضدعفونی‌کننده کلرهگزیدین بر روی سویه‌های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو بود.

مواد و روش کار: نمونه‌ها از بخش ICU بیمارستان‌های شهر قزوین جمع‌آوری شدند. تمامی ایزوله‌ها به روش فنوتایپی مورد بررسی قرار گرفتند. اثر کلرهگزیدین بر روی سویه‌های انجام شد.

یافته‌ها: از ۷۰ ایزوله اشریشیا کلی ۴۵ ایزوله MDR بودند و از ۷۴ ایزوله کلبسیلا پنومونیه ۸۳/۳ بود. تمامی نمونه دارای حساسیت یکسان به کلرهگزیدین بودند. EDTA اثر هم‌افزایی بر این دو ماده نداشت.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه ما نشان داد که کلرهگزیدین به‌طور مؤثری می‌تواند سویه‌های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده و غیر تولیدکننده بیوفیلیم را از بین ببرد. بنابراین در غلظت‌های پایین از این ماده ضدعفونی‌کننده می‌توان در جهت کنترل مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در باکتری اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو در عفونت‌های بیمارستانی استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: کلرهگزیدین، بتالاکتاماز، اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و پنجم، شماره پنجم، ص ۴۳۳-۴۲۵، مرداد ۱۴۰۳

آدرس مکاتبه: قزوین، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی قزوین، تلفن: ۰۹۱۲۰۴۷۳۲۶۴

Email: Farhadnikkhahi@gmail.com

مقدمه

خانواده انتروباکتریاسه بزرگ‌ترین و ناهمگون‌ترین مجموعه باسیل‌های گرم منفی هستند که از لحاظ بالینی اهمیت دارند. آن‌ها بسیاری از بیماری‌های بالینی از قبیل آبسه، پنومونی، مننژیت، سپتی سمی و عفونت‌های ادراری را باعث می‌شوند (۱). جنس اشریشیا شامل گونه اشریشیا کلی است که موضوع اغلب تحقیقات علمی است. این گونه دارای سروتیپ‌ها و بیوتیپ‌های زیادی است و در بین فلور طبیعی ساکن روده بزرگ انسان، شایع‌ترین عامل بیماری‌زای جداشده از موارد عفونت مجاری ادراری، عفونت زخم، پنومونی، مننژیت و عفونت خون است (۲). کلبسیلا پنومونیه یکی

از عوامل عفونت‌های سیستم ادراری، عفونت‌های زخم، باکتری می و مننژیت است. اگرچه ممکن است عامل ایجاد پیلونفریت و سیستیت در بیماران دارای کاتتر باشد اما بندرت باعث ایجاد این عفونت‌ها در افراد دیگر می‌شود. سویه‌های عامل ایجاد عفونت مجاری ادراری سروتیپ‌های ۲۴، ۱۰، ۹، ۸ کپسولی هستند. اعضا جنس کلبسیلا دارای کپسول واضح می‌باشند که مسئول ایجاد ظاهر موکوییدی در کلونی‌ها و افزایش بیماری‌زایی ارگانیزم در vivo است (۳). آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان درمان اصلی عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها است. اما کاربرد این مواد ضد میکروبی به دلیل ظهور مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در پاتوژن‌های باکتریایی،

^۱ دانشجوی پزشکی عمومی، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی قزوین، قزوین، ایران

^۲ دانشجوی پزشکی عمومی، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی قزوین، قزوین، ایران

^۳ دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی قزوین، قزوین، ایران

^۴ استادیار باکتری شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی قزوین، قزوین، ایران

^۵ استادیار باکتری شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی قزوین، قزوین، ایران (نویسنده مسئول)

بیمارستانی مانند کلبسیلا پنومونیه و/شریشیا کلی را مورد ارزیابی قرار دادیم.

مواد و روش کار

جداسازی باکتری‌ها: جهت انجام این مطالعه تجربی، با استفاده از نمونه‌گیری آسان و در دسترس تعداد ۷۰ جدایه/شریشیا کلی و ۷۴ جدایه کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بخش ICU بیمارستان ولایت شهر قزوین جمع‌آوری شد. بلافاصله بعد از نمونه‌گیری، تمامی نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از بخش میکروب‌شناسی بیمارستان در ظروف و شرایط کاملاً استریل به مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین منتقل شدند. نمونه‌ها جهت جداسازی اولیه باکتری‌ها روی محیط‌های کشت عمومی، انتخابی و افتراقی مانند بلاد آگار و مک کانکی آگار کشت و به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از رنگ‌آمیزی گرم آزمایش‌های میکروب‌شناسی و بیوشیمیایی مربوط به شناسایی باکتری‌ها شامل کشت بر روی محیط TSI، اکسیداز، نتایج آزمون MRVP، حرکت در محیط SIM، اندول و تست سیرتات انجام شد. بعد از تعیین هویت ایزوله‌ها به‌منظور نگهداری طولانی‌مدت باکتری‌ها، در محیط کشت TSB حاوی ۱۵ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام مطالعات بعدی، ذخیره شدند.

تست حساسیت ضد میکروبی: الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای هریک از نمونه‌های بالینی بر روی مولر-هینتون آگار (Liofilchem- ایتالیا) با استفاده از روش کربی-بائر دیسک (Kirby-Bauer) انجام شد (۱۸). دیسک‌های انتخابی بر اساس دستورالعمل استاندارد کلینیک و آزمایشگاه استاندارد مرجع (CLSI 2023) انتخاب شدند که شامل مروپنم (۱۰ μg)، سیپروفلوکساسین (۱۰ μg)، سفنازیدیم (۳۰ μg)، سفوناکسیم (۳۰ μg)، سفیپیم (۳۰ μg)، نیتروفورانتوئین (۳۰۰ μg)، سولفامتوکسازول-تری متوپریم (۱۲۵/۲۳۷۵ μg) و سفوکسیتین (۳۰ μg) بودند. با توجه به اندازه قطر هاله عدم رشد، تفسیر نتایج بر اساس دستورالعمل جهانی CLSI 2023 انجام شد و به‌صورت مقاوم، حساسیت بینابینی و حساس تفسیر و فنوتایپ‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در ایزوله‌ها بر اساس تعاریف زیر مشخص گردید به این صورت که فنوتیپ MDR به ایزوله‌ای اطلاق می‌گردد که حداقل به یک آنتی‌بیوتیک در سه گروه مختلف آنتی‌بیوتیکی غیرحساس باشد. فنوتیپ XDR به ایزوله‌ای اطلاق می‌شود که حداقل به یک آنتی‌بیوتیک در همه به‌جز یک یا دو گروه آنتی‌بیوتیکی غیرحساس باشد و فنوتیپ PDR به ایزوله‌ای تعلق

دچار محدودیت و یا حتی بعضی مواقع بی‌اثر می‌باشند (۴،۵). مرکز کنترل بیماری اروپا (ECDC) مقاومت چند دارویی (MDR) را به‌عنوان "عدم حساسیت اکتسابی به حداقل ۱ عامل ضد میکروبی در سه دسته ضد میکروبی یا بیشتر" تعریف می‌کند (۶،۷). درمان‌های آنتی‌بیوتیکی در عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم به چند دارو اغلب با شکست مواجه می‌شود که این شکست منجر به افزایش مرگ‌ومیر در بین بیماران می‌شود (۸). در این میان سویه‌هایی که توانایی تشکیل جوامعی از میکروارگانیسم‌ها را بر روی سطوح زنده و غیرزنده را دارا هستند، در برابر عوامل ضد میکروبی اعم از آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضد عفونی‌کننده (۹،۱۰)، هزار برابر مقاوم‌تر از باکتری‌های موجود در حالت پلانکتون هستند (۱۱). به این جوامع و شبکه‌ای از میکروارگانیسم‌های زنده، بیوفیلیم گفته می‌شود (۱۲،۱۳). بیوفیلیم‌ها توانایی بقا و سازگاری با انواع تنش‌ها را به سلول‌ها می‌دهند (۱۴). مواد ضد عفونی و استریلیزاسیون و همچنین سایر فن‌های آسپتیک برای پیشگیری و کنترل عفونت‌های بیمارستانی بسیار مهم هستند. کلرهگزیدین گلوکونات، یک ماده ضد عفونی‌کننده بی‌گوانید کاتیونی است. به نظر می‌رسد که فعالیت ضد میکروبی کلرهگزیدین به دلیل اختلال در غشای سیتوپلاسمی و در نتیجه با رسوب محتویات سلولی مرتبط باشد. فعالیت ضد میکروبی کلرهگزیدین کندتر از الکل‌ها است. دارای فعالیت خوب در برابر باکتری‌های گرم مثبت، تا حدی کمتر در برابر باکتری‌های گرم منفی و قارچ‌ها و حداقل فعالیت در برابر مایکوباکتریوم‌ها است. از ضد عفونی‌کننده‌های بسیار محبوب، کلرهگزیدین است که روی اسپور تأثیری ندارد (۱۵). کلرهگزیدین گلوکونات در تعدادی از داروهای بهداشتی دست استفاده شده است. ترکیبات آبی یا شوینده حاوی ۵/۰ درصد، ۷۵/۰ درصد، و یا ۱ درصد کلرهگزیدین مؤثرتر از صابون معمولی هستند، اما از ترکیبات شوینده ضد عفونی‌کننده حاوی ۴ درصد کلرهگزیدین گلوکونات کمتر مؤثر هستند. داروهای دارای ۲ درصد کلرهگزیدین گلوکونات نسبت به داروهای ۴ درصد کلرهگزیدین تأثیر کمتری دارند. به‌خوبی توسط پوست تحمل می‌شود، و به‌راحتی توسط اپیدرم جذب می‌شود. به همین دلیل کلرهگزیدین از رشد باکتری‌ها، به‌ویژه گونه‌های گرم مثبت، از جمله *استافیلوکوکوس* / *پیدرمیدیس* عامل اثنولوزیک مکرر عفونت‌های مربوط به کاتتر محافظت می‌کند. کلرهگزیدین در مقایسه با پویدونید، ضد عفونی‌کننده مؤثرتری در نظر گرفته می‌شود (۱۶،۱۷).

علیرغم مطالعات گسترده در مورد استفاده از محلول‌های کلرهگزیدین در ضد عفونی‌سازی بیمارستان، گزارش‌ها نشان داده است که در سال‌های اخیر شیوع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و مقاومت به ماده ضد عفونی‌کننده در حال گسترش است لذا هدف این مطالعه ارزیابی اثر کلرهگزیدین به‌عنوان یکی از ضد عفونی‌کننده‌های رایج بیمارستانی بر روی عوامل مهم عفونت

می‌گیرد که به همه گروه‌های آنتی‌بیوتیکی مورد آزمایش غیرحساس باشد.

تعیین حداقل غلظت مهار (MIC) و تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) برای کلرگزیدین: برای انجام MIC از روش میکروبراث دایلوژن با استفاده از پلیت‌های ۹۶ تایی استفاده شد. در روش میکروبراث دایلوژن روش کار به این صورت بود که از میکروپلیت‌های ۹۶ تایی استفاده کرده در ابتدا به همه چاهک‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر TSB با شرایط استریل اضافه کردیم سپس در چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر کلرگزیدین ریخته خوب مخلوط کرده سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن را به چاهک دوم و تا انتها ادامه داده و از چاهک آخر ۱۰۰ میکرولیتر دور ریختیم. درنهایت به همه چاهک ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری (10^6 CFU/ml) اضافه کرده به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار دادیم و از نظر کدورت چاهک‌ها را بررسی کردیم رقت‌ها شامل ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴، ۱/۱۲۸، ۱/۲۵۶، ۱/۵۱۲، ۱/۱۰۲۴ بود. شاهد‌های مثبت شامل ۱۰۰ میکرولیتر TSB و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی که با رشد باکتری همراه است (کدورت). کنترل‌های منفی شامل ۱۰۰ میکرولیتر TSB و ۱۰۰ میکرولیتر ضدعفونی‌کننده بدون رشد باکتریایی. کمترین غلظت که مانع رشد باکتری‌ها می‌شود به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) گزارش شد. در ادامه MIC از کلیه لوله‌های فاقد کدورت و دارای کدورت به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط مولر هیتون اگار کشت داده و اگر پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه ۹۹/۹ درصد از باکتری‌ها رشد ننموده‌اند (یعنی عدم رشد یا رشد کمتر از ۱۵ کلنی) آن رقت به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) در نظر گرفته شد.

بررسی اثر هم‌افزایی (سینرژسم) مواد ضدعفونی‌کننده انتخابی و ماده اتیلن دی آمین تترااستیک اسید (EDTA): برای بررسی اثر هم‌افزایی ماده ضدعفونی‌کننده کلرگزیدین و EDTA، از روش چک‌برد استفاده شد (۱۹). در این روش درون پلیت ۹۶ خانه ای، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف کلرگزیدین با ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف EDTA با یکدیگر ترکیب شدند. درنهایت ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (10^6 CFU/ml) به هر چاهک حاوی دو ماده مورد بررسی، اضافه شد. در ردیف و ستون آخر پلیت غلظت‌های مختلف هر ماده به‌تنهایی به همراه سوسپانسیون تهیه‌شده از باکتری به‌منظور بررسی MIC هر ماده مورد ارزیابی قرار گرفت. چاهک آخر تنها حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از

سوسپانسیون باکتری به‌عنوان کنترل مثبت بود. انکوبه گذاری به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در دمای 35 ± 2 درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از گذشت این مدت زمانی، نتایج به دست آمد با نتایج قبلی مقایسه شد و اثر هم‌افزایی آن مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

در این مطالعه، در مجموع تعداد ۷۰ جدایه اشریشیا کلی و ۷۴ جدایه از کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های بالینی بخش ICU بیمارستان ولایت شهر قزوین جمع‌آوری شد.

حساسیت ایزوله‌های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه بر اساس روش دیسک دیفیوژن و طبق دستورالعمل‌های CLSI2023 برای آنتی‌بیوتیک‌های مروینم ($10 \mu\text{g}$)، سیپروفلوکساسین ($10 \mu\text{g}$)، سفنازیدیم ($30 \mu\text{g}$)، سفوتاکسیم ($30 \mu\text{g}$)، سفپیم ($30 \mu\text{g}$)، نیتروفورانتوئین ($300 \mu\text{g}$)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول ($1.25/23.75 \mu\text{g}$) و سفوکسیتین ($30 \mu\text{g}$) در جدول‌های ۱ و ۲ است. در این مطالعه بیشترین میزان مقاومت برای اشریشیا کلی تری متوپریم-سولفامتوکسازول و برای کلبسیلا پنومونیه سفوتاکسیم، سفنازیدیم و تری متوپریم-سولفامتوکسازول و بیشترین حساسیت برای اشریشیا کلی نیتروفورانتوئین و سیپروفلوکساسین و برای کلبسیلا پنومونیه نیتروفورانتوئین و مروینم بود.

جهت بررسی اثر کلرگزیدین بر روی سویه‌های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه از محلول کلرگزیدین ۲۰ درصد استفاده شد و با استفاده از روش رقت سازی سریالی (serial dilution) رقت‌های مختلفی از ۱۰ درصد تا ۰/۰۰۱ درصد از محلول استوک اولیه تهیه شد. جهت بررسی اثر بین کلرگزیدین و EDTA از محلول ۵۰ میلی مولار EDTA استفاده شد. رقت‌های مختلف از این محلول نیز با استفاده از روش serial dilution تهیه شد. آزمایش با استفاده از روش چک‌برد انجام شد. نتایج نشان داد که در تمامی رقت‌های تهیه‌شده از محلول کلرگزیدین دارای اثر مهار بر روی سویه‌های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه است اما EDTA هیچ اثر مهار به‌تنهایی بر روی سویه‌های کلبسیلا نداشته است. به دلیل اثر مهارکنندگی قوی کلرگزیدین بر روی سویه‌های اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه، افزایش اثر و یا اثر آنتاگونیسمی در ترکیب با EDTA مشاهده نشد (جدول ۳). اثرات کلرگزیدین بر روی هر دو باکتری یکسان بود.

جدول (۱): نتایج آنتی‌بیوگرام ایزوله‌های اشریشیا کلی															
آنتی‌بیوتیک		مقاوم (%)		نیمه حساس (%)		حساس (%)									
سفوتاکسیم		۳۲ (۴۶)		۹ (۱۲)		۲۹ (۴۲)									
تری متوپریم - سولفامتوکسازول		۳۲ (۴۵)		۴ (۶)		۳۴ (۴۹)									
سیپروفلوکساسین		۲۰ (۲۹)		۶ (۸)		۴۴ (۶۳)									
مروپنم		۳ (۵)		۸ (۱۱)		۵۹ (۸۴)									
نیتروفورانتوئین		۳ (۳)		۱ (۲)		۶۶ (۹۵)									
سفوکسیتین		۱۵ (۲۰)		۵ (۷)		۵۰ (۷۲)									
سفپیم		۹ (۲۷)		۱۷ (۲۴)		۳۴ (۴۹)									
سفتازیدیم		۲۷ (۳۸)		۵ (۷)		۳۸ (۵۵)									
جدول (۲): نتایج آنتی بیوگرام کلبسیلا پنومونیه															
آنتی‌بیوتیک		مقاوم (%)		نیمه حساس (%)		حساس (%)									
سفوتاکسیم		۴۷ (۶۳/۵)		۷ (۹/۵)		۲۰ (۲۷)									
تری متوپریم - سولفامتوکسازول		۴۴ (۵۹/۵)		۳ (۴/۱)		۲۷ (۳۶/۵)									
سیپروفلوکساسین		۳۲ (۴۳/۲)		۱۰ (۱۳/۵)		۳۲ (۴۳/۲)									
مروپنم		۲۰ (۲۷)		۸ (۱۰/۸)		۴۶ (۶۲/۲)									
نیتروفورانتوئین		۲۴ (۳۲/۴)		۴ (۵/۴)		۴۶ (۶۲/۲)									
سفوکسیتین		۳۱ (۴۱/۹)		۶ (۸/۱)		۲۷ (۳۶/۵)									
سفپیم		۴۱ (۵۵/۴)		۶ (۸/۱)		۲۷ (۳۶/۵)									
سفتازیدیم		۴۶ (۶۲/۲)		۴ (۵/۴)		۲۴ (۳۲/۴)									
جدول (۳): بررسی اثر بین کلرگزیدین و EDTA															
غلظت‌های مختلف (EDTA)		کلرگزیدین (%) EDTA													
		۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۴	۰/۰۰۹	۰/۰۱۹	۰/۰۳	۰/۰۷	۰/۱۵	۰/۳	۰/۶	۱/۲۵	۲/۵	۵	۱۰
رشد		عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	۱۷
رشد		عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	۸.۵
رشد		عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	۴.۲۵
رشد		عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	۲.۱
رشد		عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	۱
رشد (چاهک کنترل مثبت)		عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	۰
رشد (غلظت‌های مختلف کلرگزیدین)		عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	۰

بحث و نتیجه‌گیری

عفونت‌های بیمارستانی، ناشی از *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* به‌عنوان یک مسئله بزرگ در بیمارستان طبقه بندی شده‌اند. نتیجه این مشکل، هزینه‌های پزشکی برای سیستم‌های مراقبت‌های بهداشتی است بالا بوده‌اند (۲۰). مقاومت ضد میکروبی یک نگرانی جهانی است که سالانه سبب مرگ‌ومیر زیادی می‌شود. در این بین، تولید بتالاکتام‌ها توسط باسیل‌های گرم منفی، سبب ایجاد مقاومت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام شده است (۲۱). در میان ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه*، شیوع ایزوله‌های مقاوم به چند دارو ۸۳/۳ درصد و برای *اشریشیا کلی* ۴۵ درصد بود. نتایج مطالعه انجام شده در سال ۲۰۲۰ در ایران نشان داد ۷۸/۱ درصد ایزوله‌های *اشریشیا کلی* MDR بودند (۲۲). حجم و منبع نمونه‌های جمع‌آوری شده در این مطالعه با مطالعه ما متفاوت بود. این سویه‌ها از نمونه‌های مدفوعی جمع‌آوری شده از بیماران اطفال بود، در صورتی که نمونه‌های مطالعه ما از نمونه‌های بالینی متفاوت از بخش ICU بزرگسالان به دست آمده بود. میزان جدایه‌های MDR *کلبسیلا پنومونیه* در مطالعه ایران در سال ۲۰۲۱، ۶۷ درصد و میزان جدایه‌های MDR *کلبسیلا پنومونیه* در مطالعه عربستان سعودی در سال ۲۰۲۳، ۶۶/۸ درصد بود (۲۳، ۲۴). میزان بالای سویه‌های MDR در مطالعه ما در مقایسه با مطالعه انجام شده در سال ۲۰۲۱ در ایران، نشان می‌دهد که شیوع این سویه‌ها در ایران رو به افزایش است و با توجه به همزمانی انجام مطالعه حاضر با مطالعه انجام شده در عربستان، می‌تواند نشان دهنده این باشد که میزان شیوع سویه‌های MDR در ایران در مقایسه با کشور همسایه مانند عربستان سعودی، بالاتر است که می‌تواند زنگ به دلیل مصرف بالا و یا نامناسب از آنتی‌بیوتیک‌ها در کشور باشد که نیازمند مدیریت و نظارت صحیح می‌باشد. با افزایش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده برای مهار تکثیر و گسترش پاتوژن‌ها، افزایش یافته است (۲۵، ۲۶). با این حال، استفاده بیش از حد و نادرست و همچنین آموزش ناکافی برای تهیه و نگهداری مواد ضدعفونی‌کننده بیمارستانی از این مواد می‌تواند باعث کاهش حساسیت و حتی مقاومت میکروارگانیسم‌ها به موادهای ضدعفونی‌کننده شود (۲۷، ۲۸). به همین دلیل ضروری است تا اثر پر مصرف‌ترین مواد ضدعفونی‌کننده بر روی سویه‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گیرد. بنابراین یکی از اهداف این پژوهش ارزیابی حساسیت ایزوله‌ها به ماده ضدعفونی‌کننده کلرهگزیدین بود. در مقایسه با بسیاری از بررسی‌های مقاومت در مورد آنتی‌بیوتیک‌ها، تعداد تحقیقات جهانی در مورد مقاومت بیوسیدها کافی نیست. به

دلیل اهمیت بالینی اثربخشی کلرهگزیدین بیمارستانی در برابر ایزوله‌های بالینی *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* مورد بررسی قرار گرفت. اثربخشی کلرهگزیدین در غلظت ۰/۰۰۱ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت به‌عنوان MBC برای تمام جدایه‌های موجود تعیین شد. با توجه به اینکه باکتری‌ها در برابر مواد ضدعفونی‌کننده مقاوم می‌شوند، ضدعفونی‌کننده‌های جدید با ترکیبات یا مخلوط‌های جدید برای از بین بردن این جدایه‌ها باید در نظر گرفته شود. در حال حاضر، EDTA به‌عنوان یک ضد میکروبی تأیید شده است عاملی برای کاهش خطر تشکیل بیوفیلم باکتریایی و استعمار EDTA به‌عنوان یک شلاتور فلزی شناخته می‌شود و لایه بیرونی لیپوپلی ساکارید گرم منفی را مختل می‌کند و غشاء باکتری‌ها را نسبت به مواد ضدعفونی‌کننده نفوذ پذیرتر می‌کند (۲۹). بنابراین یکی دیگر از اهداف مطالعه فعلی تعیین اثر هم‌افزایی EDTA در ترکیب با کلرهگزیدین بود. در بررسی فعلی، افزودن EDTA به کلرهگزیدین اثر سینرژیسم نشان نداد. این یافته می‌تواند نشان دهنده این باشد که کلرهگزیدین به تنهایی تا غلظت ۰/۰۰۱ درصد می‌تواند باعث از بین رفتن و مرگ باکتری شود و EDTA هیچ اثر ترکیبی با کلرهگزیدین در ارتباط با کشتن باکتری‌ها از خود نشان ندهد. اثر ضدعفونی‌کننده‌ها در حال حاضر در حال بررسی است. به‌منظور کاهش نرخ مقاومت در حال ظهور در میان باکتری‌های جدا شده بالینی برای چندین دهه، EDTA به‌عنوان یک عامل تقویت‌کننده شناخته شده است. چندین مطالعه نشان داد که توانایی EDTA در جداسازی کاتیون‌ها است (Mg^{2+} ، Ca^{2+} و Fe^{3+}) و در نتیجه باعث افزایش اثر سایر عوامل ضد میکروبی می‌گردد (۳۰-۳۲). ترکیب آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر عوامل ضد میکروبی با دی سدیم EDTA به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است (۳۳).

EDTA دی سدیم یک عامل ضد میکروبی قوی نیست، حتی زمانی که غلظت بالایی دارد و قادر به کشتن باکتری‌ها نیست که با نتیجه مطالعه حاضر همخوانی دارد. از سوی دیگر، برخی مطالعات نشان دادند که EDTA تتراسدیم دارای فعالیت ضد میکروبی قوی می‌باشد به‌طوری‌که محلول تترا سدیم EDTA توانست همه میکروارگانیسم‌های آزمایش شده در مطالعه را در غلظت ۴ درصد یا کمتر، و طی مدت زمان کمتر از ۲۴ ساعت از بین ببرد (۳۴). بنابراین در مواقعی که کاهش حساسیت به مواد ضدعفونی‌کننده مثل کلرهگزیدین در میان سویه‌های پاتوژن مشاهده شد، می‌توان از EDTA برای افزایش اثر این مواد استفاده کرد. با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر و همچنین گزارش مطالعات انجام شده در رابطه با مقاومت به کلرهگزیدین (۳۵)، پیشنهاد می‌شود که به‌منظور کاهش

است، پیشنهاد می‌شود که این بررسی اثر بر روی سویه‌های مختلف جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف صورت بگیرد تا تصمیم‌گیری در ارتباط با استفاده از این ماده ضدعفونی‌کننده در حوزه بالین به درستی انجام گیرد.

تشکر و قدردانی:

از زحمات تمامی کارشناسان مرکز تحقیقات میکروپزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین تقدیر و تشکر می‌شود.

حمایت مالی:

ندارد.

تضاد منافع:

نویسندگان این مطالعه اعلام می‌دارند که هیچ تضاد منافع مرتبط با نگارش و یا انتشار این مقاله ندارند.

ملاحظات اخلاقی:

این مقاله حاصل پایان نامه مقطع دکتری رشته پزشکی عمومی با شماره IR.QUMS.REC.1403.073 در دانشگاه علوم پزشکی قزوین می‌باشد.

فشار انتخابی و جلوگیری از ایجاد مقاومت در برابر کلرهگزیدین، برای استفاده و کاربرد این ماده باید غلظت مؤثره آن مورد ارزیابی قرار گیرد. نتایج مطالعه ما نشان داد که غلظت پایینی از این ماده (۰/۰۰۱ درصد) به‌طور مؤثری می‌تواند سویه‌های /شریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو را از بین ببرد.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج مطالعه فعلی ما، فراوانی سویه‌های مقاوم به چند دارو در شهر قزوین بالاست و بررسی متون گذشته نشان داده که در حال افزایش است. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که ماده کلرهگزیدین دارای کارایی مناسب برای کنترل عامل باکتریال مطالعه می‌باشد و از آن می‌توان با غلظت‌های پایین برای کنترل عفونت بیمارستان هم استفاده کرد.

مشکلات و محدودیت‌های مطالعه:

یکی از مشکلات مطالعه حاضر محدودیت در انتخاب بیمارستان‌ها و جمع‌آوری نمونه بود، به‌طوری که فقط بخش ICU بیمارستان ولایت شهر قزوین مورد ارزیابی قرار گرفت، همین موضوع می‌تواند تعمیم‌پذیری نتایج را با مشکل رو به رو کند. با توجه به کاهش اثر ضدعفونی‌کننده‌ها که در برخی از مطالعات گزارش شده

References:

1. Isvand A, Yahyavi M, Asadi-Samani M, Kooti W, Davoodi-Jouneghani Z. The study of bacteriological factors and antibiotic resistance in women with UTI referred to the Razi laboratory in Dezful. J Ilam Univ Med Sci 2014;22(4):199-205.
2. De Francesco MA, Ravizzola G, Peroni L, Negrini R, Manca N. Urinary tract infections in Brescia, Italy: etiology of uropathogens and antimicrobial resistance of common uropathogens. Med Sci Monit 2007 Jun;13(6):BR136-44.
3. Alves MS, Alves MS, Dias RC, de Castro AC, Riley LW, Moreira BM. Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative Klebsiella spp. J Clin Microbiol 2006 Oct;44(10):3640-6. <https://doi.org/10.1128/JCM.00940-06>
4. Walker MM, Roberts JA, Rogers BA, Harris PNA, Sime FB. Current and Emerging Treatment Options for Multidrug Resistant Escherichia coli Urosepsis: A Review. Antibiotics [Internet]. 2022 Dec 15 [cited 2024 Oct 11];11(12):1821. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9774639/> <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121821>
5. Ibrahim ME, Bilal NE, Hamid ME. Increased multi-drug resistant Escherichia coli from hospitals in Khartoum state, Sudan. Afr Health Sci 2012;12(3):368-75. <https://doi.org/10.4314/ahs.v12i3.19>
6. Al-Sheboul. Al-Sheboul SA, Al-Madi GS, Brown B, Hayajneh WA. Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamases in Multidrug-Resistant Klebsiella pneumoniae Isolates in Jordanian Hospitals. J Epidemiol Glob Health 2023 Jun;13(2):180-90. <https://doi.org/10.1007/s44197-023-00096-2>
7. Gholipour A. Gholipour A, Soleimani N, Shokri D, Mobasherizadeh S, Kardi M, Baradaran A. Phenotypic and Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase Produced by Escherichia coli, and Klebsiella pneumoniae Isolates in an Educational Hospital. Jundishapur J

- Microbiol 2014 Oct;7(10):e11758.
<https://doi.org/10.5812/jjm.11758>
- 8 .Kuloglu TO, Unuvar GK, Cevahir F, Kilic AU, Alp E. Risk factors and mortality rates of carbapenem-resistant Gram-negative bacterial infections in intensive care units. *J Intensive Med* 2024;4(3):347-54.
<https://doi.org/10.1016/j.jointm.2023.11.007>
 - 9 .Yin W. Yin W, Wang Y, Liu L, He J. Biofilms: The Microbial "Protective Clothing" in Extreme Environments. *Int J Mol Sci* 2019 Jul 12;20(14):3423.
<https://doi.org/10.3390/ijms20143423>
 - 10 .Koerdt A. Koerdt A, Gödeke J, Berger J, Thormann KM, Albers SV. Crenarchaeal biofilm formation under extreme conditions. *PLoS One* 2010 Nov 24;5(11):e14104.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014104>
 - 11 .Olson ME. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 2002 Apr;66(2):86-92.
 - 12 .Li J, Liu D, Tian X, Koseki S, Chen S, Ye X, Ding T. Novel antibacterial modalities against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* derived from plants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2019;59(sup1):S153-S161.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1541865>
 - 13 .Silva VO, Soares LO, Silva Júnior A, Mantovani HC, Chang YF, Moreira MA. Biofilm formation on biotic and abiotic surfaces in the presence of antimicrobials by *Escherichia coli* Isolates from cases of bovine mastitis. *Appl Environ Microbiol* 2014 Oct;80(19):6136-45.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01953-14>
 - 14 .Casalini J. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos. Universidade Federal de Pelotas. 2008.
 - 15 .Dahiya S, Singla P, Chaudhary U, Singh B. Carbapenemases: A Review. *Int J Adv Health Sci* 2015;2(4):11-17.
 - 16 .Raveh D, Yinnon AM, Broide E, Rudensky B. Susceptibilities of ESBL-Producing Enterobacteriaceae to Ertapenem, Meropenem and Piperacillin-Tazobactam with and without Clavulanic Acid. *Chemotherapy* 2007;53(3):185-9. <https://doi.org/10.1159/000100516>
 - 17 .Yazdi M, Nazemi A, Mir Inargasi M, Khataminejad MR, Sharifi S, Babai Kochkaksaraei M. Prevalence of SHV/CTX-M/TEM (ESBL) beta-lactamase resistance genes in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Tehran, Iran.
 - 18 .Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf [Internet]. [cited 2024 Oct 11]. Available from:
<https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>
 - 19 .White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1996 Aug [cited 2024 Sep 21]; Available from:
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.40.8.1914> <https://doi.org/10.1128/AAC.40.8.1914>
 - 20 .Kahan JS, Kahan FM, Goegelman R, Currie SA, Jackson M, Stapley EO, et al. Thienamycin, a new .BETA.-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J Antibiot (Tokyo)* 1979;32(1):1-12.
<https://doi.org/10.7164/antibiotics.32.1>
 - 21 .Murphy CN, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiol*. 2012 Aug;7(8):991-1002.
<https://doi.org/10.2217/fmb.12.74>
 - 22 .Abbasi E, Mondanizadeh M, van Belkum A, Ghaznavi-Rad E. Multi-Drug-Resistant Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes in Pediatric Patients with Gastroenteritis from

- Central Iran. Infect Drug Resist 2020;1387-96.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S247732>
- 23 .Ibrahim ME. Risk factors in acquiring multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in a hospital setting in Saudi Arabia. Sci Rep 2023;13(1):11626.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-38871-7>
- 24 .Shadkam S, Goli HR, Mirzaei B, Gholami M, Ahanjan M. Correlation between antimicrobial resistance and biofilm formation capability among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients in Iran. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2021;20(1):13.
<https://doi.org/10.1186/s12941-021-00418-x>
- 25 .Maillard JY. Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern? J Hosp Infect. 2007 Jun;65 Suppl 2:60-72. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(07\)60018-8](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(07)60018-8)
- 26 .Maillard JY. Bacterial target sites for biocide action. J Appl Microbiol. 2002;92 Suppl:16S-27S.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.3.x>
- 27 .Forbes S, Latimer J, Bazaid A, McBain AJ. Altered Competitive Fitness, Antimicrobial Susceptibility, and Cellular Morphology in a Triclosan-Induced Small-Colony Variant of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2015 Aug;59(8):4809-16.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00352-15>
- 28 .Wieland N, Boss J, Lettmann S, Fritz B, Schwaiger K, Bauer J, Hölzel CS. Susceptibility to disinfectants in antimicrobial-resistant and -susceptible isolates of *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from poultry-ESBL/AmpC-phenotype of *E. coli* is not associated with resistance to a quaternary ammonium compound, DDAC. J Appl Microbiol 2017 Jun;122(6):1508-1517.
<https://doi.org/10.1111/jam.13440>
- 29 .Nikaido H, Rosenberg EY, Foulds J. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with beta-lactams in intact cells. J Bacteriol. 1983 Jan;153(1):232-40.
<https://doi.org/10.1128/jb.153.1.232-240.1983>
- 30 .Hawkey PM, Livermore DM. Carbapenem antibiotics for serious infections. BMJ 2012 May 31;344:e3236. <https://doi.org/10.1136/bmj.e3236>
- 31 .Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, Present, and Future. Antimicrob Agents Chemother 2011 Nov;55(11):4943-60.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>
- 32 .Von Döhren H. Antibiotics: Actions, origins, resistance, by C. Walsh. 2003. Washington, DC: ASM Press. 345 pp. \$99.95 (hardcover). Protein Sci 2009 Jan 1;13(11):3059-60.
<https://doi.org/10.1110/ps.041032204>
- 33 .KRAUß J, van der LINDEN M, Grebe T, Hakenbeck R. Penicillin-Binding Proteins 2x and 2b as Primary PBP Targets in *Streptococcus pneumoniae*. Microb Drug Resist 1996 Jan;2(2):183-6.
<https://doi.org/10.1089/mdr.1996.2.183>
- 34 .Tenover FC, Raney PM, Williams PP, Rasheed JK, Biddle JW, Oliver A, et al. Evaluation of the NCCLS Extended-Spectrum β -Lactamase Confirmation Methods for *Escherichia coli* with Isolates Collected during Project ICARE. J Clin Microbiol 2003 Jul;41(7):3142-6.
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.3142-3146.2003>
- 35 .Cieplik F, Jakubovics NS, Buchalla W, Maisch T, Hellwig E, Al-Ahmad A. Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria - Is There Cause for Concern? Front Microbiol 2019 Mar 22;10:587.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00587>

EVALUATION OF THE EFFECT OF CHLORHEXIDINE AND EDTA ON MULTI-DRUG RESISTANT STRAINS OF KLEBSIELLA PNEUMONIAE AND BIOFILM-PRODUCING AND NON-PRODUCING ESCHERICHIA COLI

Shayan Safavi¹, Melika Peyman Gohar², Mohadeseh Khakpour³, Fatemeh Fardsaneh⁴, Farhad Nikkhahi^{5*}

Received: 24 July, 2024; Accepted: 12 October 2024, 2024

Abstract

Background & Aims: *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* are important bacteria that cause hospital-acquired infections and have become resistant to beta-lactam antibiotics through the acquisition of beta-lactamase-encoding plasmids. Resistance to disinfectants has also been observed in these strains. Therefore, the aim of this study was to investigate the antimicrobial effect of the disinfectant chlorhexidine on multidrug-resistant strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*.

Materials & Methods: Clinical samples were collected from the intensive care unit of Qazvin hospital. All isolates were analysed by phenotypic method. Finally, the combined effect of chlorhexidine and EDTA on the collected strains was performed.

Results: 45% of the 70 *Escherichia coli* isolates were MDR and 83.3% of the 74 *Klebsiella pneumoniae* isolates. All samples were equally sensitive to chlorhexidine. EDTA showed no synergistic effect with this substance.

Conclusion: The results of our study show that chlorhexidine can effectively destroy *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing and non-producing biofilm strains. Therefore, this disinfectant can be used at low concentrations to control antibiotic resistance in multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bacteria in hospital-acquired infections.

Keywords: Chlorhexidine, beta-lactamase, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*

Address: Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Tel: +989120473264

Email: Farhadnikkhahi@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2024; 35(5): 433 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

¹ General medicine student, Medical Microbiology Research Center, Qazvin, Iran

² General medicine student, Medical Microbiology Research Center, Qazvin, Iran

³ MSc in Medical Microbiology, Medical Microbiology Research Center, Qazvin, Iran

⁴ Assistant Professor of Medical Bacteriology, Medical Microbiology Research Center, Qazvin, Iran

⁵ Assistant Professor of Medical Bacteriology, Medical Microbiology Research Center, Qazvin, Iran
(Corresponding Author)