

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

شهره افشاری‌اوری\*<sup>۱</sup>، سیال روتا<sup>۲</sup>، کایهان چالار<sup>۳</sup>، ایشیل فیدان<sup>۴</sup>

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 اسپینتوباکتر بومانی شناخته شده است پمپ‌های AdeABC مربوط به خانواده RND می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی فنوتیپی عملکرد پمپ‌های افلاکس AdeABC در ایزوله‌های اسپینتوباکتر بومانی نسبت به مواد ضد عفونی‌کننده بنزالکونیوم کلراید و کلرگزیدین با استفاده از مهارکننده‌های فنیل‌انیل-آرژینیل بتا نفتیل آمید (PAβN) و ۱-۱ نفتیل متیل-پپرازین (NMP) بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه ۵۰ ایزوله اسپینتوباکتر 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 کلرگزیدین به روش میکرودایلوشن بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی بالینی (CLSI) سنجیده شد. سپس (MIC) در کنار ممانعت‌کننده‌های پمپ‌های افلاکس (PAβN) و (NMP) تعیین شد.

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

**کلیدواژه‌ها:** اسپینتوباکتر بومانی، مهارکننده‌های پمپ افلاکس، فنیل‌انیل-آرژینیل بتا نفتیل آمید، ۱-۱ نفتیل متیل-پپرازین، بنزالکونیوم کلراید، کلرگزیدین

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

برای ضد عفونی کردن سطوح و جلوگیری از گسترش عفونت از آنتی‌سپتیک و دزنفکتانت‌ها در مراکز بهداشتی به‌طور گسترده استفاده می‌شود (۳) از جمله 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 کلرگزیدین که از طریق تخریب دیواره سلولی باعث مرگ باکتری‌ها می‌شوند (۴، ۵).

کاربرد وسیع این مواد سبب ایجاد افزایش مقاومت میکروبی

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

<sup>۱</sup> استادیار میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (نویسنده مسئول)

<sup>۲</sup> استاد میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه غازی

<sup>۳</sup> دانشیار میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه غازی

<sup>۴</sup> دانشیار میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه غازی

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 سوبه‌های 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 ضد میکروبی 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 اسپینتوباکتر بومانی نسبت به مواد ضد عفونی‌کننده بنزالکونیوم کلراید و کلر هگزیدین با استفاده از مهارکننده‌های فنیل‌الانیل- آرژینیل بتا نفتیل آمید (PAβN) و 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 اسپینتوباکتر بومانی از بیمارستان 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 (bioMerieux, France) 32 تعیین هویت گردید (۲۰). سپس حداقل غلظت بازدارنده نسبت به کلر هگزیدین و بنزالکونیوم کلراید به‌تنهایی و همراه با ممانعت کننده‌های افلاکس به روش میکروداپلوشن بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی بالینی (CLSI) سنجیده شد (۲۱).

### آماده‌سازی محیط‌های کشت:

به‌ویژه مقاومت متقابل به آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. مکانیسم‌های مختلفی باعث مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی (آنتی‌سپتیک‌ها و دزفکانت‌ها) می‌گردد ولی متأسفانه خیلی کم‌تر از آنتی‌بیوتیک‌ها مورد توجه 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<sup>1</sup> جزو پمپ‌های افلاکس چند دارویی بوده و جهت جابه‌جایی سوبسترا از انرژی ATP 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 به دلیل 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 AdeA، AdeB 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 از جمله فنیل‌الانیل- 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 بر پمپ 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 سوبه‌های موتانت مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، داروها و مواد شیمیایی می‌شوند. پمپ‌های افلاکس

<sup>1</sup> Resistance- Nodulation- Division

درواقع E.coli ATCC25922 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 اسینتوباکتر بومانی 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)، برونشیتال 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 (۱-۱۴) 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 ۶۴ - ۸ و مقدار MIC ۶۴ درصد از جدایه‌ها برابر با ۱۶  $\mu\text{g/ml}$  و ۲۶ درصد برابر با ۳۲  $\mu\text{g/ml}$  بود. مقدار MIC در کلرهگزیدین بین ۱۶-۱۲۸  $\mu\text{g/ml}$  و ۴۶ درصد از جدایه‌ها برابر با ۳۲  $\mu\text{g/ml}$  و ۴۲ درصد برابر با ۶۴  $\mu\text{g/ml}$  بوده است.

مقدار MIC در بنزالکونیوم کلراید به همراه PA $\beta$ N بین ۱۶  $\mu\text{g/ml}$  - ۲ و مقدار MIC ۳۸ درصد از جدایه‌ها برابر با ۱۶  $\mu\text{g/ml}$  و ۴۸ درصد برابر با ۸  $\mu\text{g/ml}$  بود. مقدار MIC در بنزالکونیوم کلراید به همراه NMP بین ۱۶  $\mu\text{g/ml}$  - ۲ و مقدار MIC ۵۲ درصد از جدایه‌ها برابر با ۴  $\mu\text{g/ml}$  و ۳۰ درصد برابر با ۸  $\mu\text{g/ml}$  بود.

مقدار MIC در کلرهگزیدین به همراه PA $\beta$ N بین ۶۴  $\mu\text{g/ml}$  - ۴ و مقدار MIC ۲۶ درصد از جدایه‌ها برابر با ۸  $\mu\text{g/ml}$ ، ۳۶ درصد برابر با ۱۶  $\mu\text{g/ml}$  بود. مقدار MIC در بنزالکونیوم کلراید به همراه NMP بین ۶۴  $\mu\text{g/ml}$  - ۲ و مقدار MIC ۳۲ درصد از جدایه‌ها برابر با ۸  $\mu\text{g/ml}$  و ۲۸ درصد برابر با ۱۶  $\mu\text{g/ml}$  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 کاهش یافته و در ۱۲-۶ درصد از جدایه‌ها تغییری دیده نشده است.

محیط کشت مولر هینتون براث (MHB TM Difco) طبق دستورالعمل شرکت دارویی در ۳ ارلن مجزا تهیه گردید. برای تهیه محیط کشت حاوی ممانعت‌کننده‌های افلاکس محلول PA $\beta$ N با فرمول (Sigma-Aldrich) C25H30N6O2.2HCL (۱۰۰ میلی‌گرم/۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر) و ۱-۱ نفتیل متیل-پپیرازین (NMP) با فرمول (Sigma) C15H18N2 (۱۰۰ میلی‌گرم/۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفولینت (DMSO-Merck)) آماده شد. به یکی از ارلن‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون براث سرد شده ۱۰۰ mg/lt محلول PA $\beta$ N و به ارلن دیگر ۱۰۰ mg/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 -  $(\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{RCl})$  ۰/۵۱۲ میلی‌گرم از پودر در ۱۰ cc 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  $128 > \mu\text{g/lt} > 0.5$  در داخل چاهک‌های میکروپلیت تهیه شد. برای تهیه رقت‌های سریال از کلرهگزیدین- (Sigma)  $(\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_{10})$  ۹۶۶ میکرولیتر در ۳۴ میکرولیتر آب مقطر حل گردید. سپس به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ رقیق شده و غلظت ۱۰۲۴ میکروگرم بر لیتر به‌دست آمد (۲۱). سپس رقت‌های سریالی در مقادیر  $256 > 1$  در چاهک‌های میکروپلیت تهیه شد.

### تهیه میزان تلقیح باکتری:

به‌منظور دستیابی به کشت تازه و فعال از باکتری‌های مورد مطالعه، باکتری از محیط کشت ذخیره به محیط تریپتیکس سوی آگار (TSA Difco) منتقل شد و در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸-۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. از کشت جدید باکتری غلظت معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه‌شده (CFU/ml)  $1 \times 10^8$  و توسط اسپکتوفتومتر در طول موج 625nm تأیید گردید. سپس به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق کرده (CFU/ml)  $1 \times 10^6$  با اضافه کردن ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به هر یک از چاهک‌های میکروپلیت حاوی 100 میکرولیتر محیط کشت غلظتی معادل (CFU/ml)  $5 \times 10^5$  به‌دست آمد (۲۱). یک لاین به‌عنوان کنترل منفی که در واقع محلول آنتی‌بیوتیک به همراه محیط مولر هینتون براث می‌باشد و یک لاین دیگر به‌عنوان کنترل مثبت که

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

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

**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-پپرازین (NMP) بر حداقل غلظت ممانعت کننده از

رشد بنزالکونیوم در جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی

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

**جدول (۴):** اثر فنیل الانیل- آرژینیل بتا نفتیل آمید (PAβN) و ۱- نفتیل متیل- پیپرازین (NMP) بر حداقل غلظت ممانعت کننده از

رشد کلرگزیدین در جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی

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

## بحث و نتیجه‌گیری

تشخیص و جلوگیری از گسترش باکتری‌های مقاوم باعث کاهش استفاده از داروها و مواد ضد عفونی‌کننده 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 جدا شده از بخش‌های مراقبت‌های ویژه بیمارستان غازی نسبت به بنزالکونیوم کلراید و کلرگزیدین به تنهایی و همراه با ممانعت کننده پمپ‌های افلاکس RND به‌طور جداگانه به روش میکرو دایلوژن انجام گرفت.

نتایج نشان می‌دهد ۸۸-۹۴ درصد از جدایه‌های اسینتوباکتر بومانی، بنزالکونیوم کلراید و کلرگزیدین 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 کلرگزیدین 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 کلرگزیدین 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 ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک‌ها و بیوسایدها به مقادیر

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 کلرگزیدین 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 دارویی مختلفی در باکتری‌ها وجود داشته و پمپ‌های افلوکس یکی از این مکانیسم‌ها می‌باشد. پمپ‌های ترشحی می‌تواند نقش مهمی در کاهش حساسیت به مواد ضد عفونی‌کننده داشته باشد ولی نقش سایر عوامل و مکانیسم‌های مقاومت نباید فراموش گردد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی است از پایان‌نامه دکتری شهره افشاری‌پوری 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 11/2003-SBE- 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, Koletsis 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

قابل توجهی افزایش یافته و اثر مهارکنندگی PA $\beta$ N 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 PA $\beta$ N 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 PA $\beta$ N و NMP را بر روی ژن Ade B در ۴۰ جدایه اسینتوباکتر بومانی و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مورد بررسی قرار داد و ملاحظه کرد خاصیت ضد میکروبی برخی آنتی‌بیوتیک‌ها همراه با مهارکننده افلوکس به مقادیر قابل توجهی افزایش یافته ولی در آمینوگلیکوزیدها تغییری چشمگیری ملاحظه نمی‌شود تأثیر مهارکننده NMP در افزایش خاصیت ضد میکروبی کینولون‌ها را بیشتر از PA $\beta$ N گزارش کرده است (۲۷).

Russell عقیده دارد که افزایش مقدار MIC مواد ضد عفونی‌کننده مانند بنزالکونیوم کلراید و کلر هگزیدین به علت استفاده در غلظت‌های بالا مشکلی از نظر ضد عفونی سطوح مختلف

- 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.

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- $\beta$ -naphthylamide. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 970-4.
15. Chapman JS. Disinfectant resistance 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  $\beta$ -naphthylamide (PABN) 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- $\beta$ -naphthylamide. *Int J Antimicrobial Agents* 2012; 39: 77- 80.
19. Mavri A, Mozina 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 arginyl- 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.



## 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<sup>\*1</sup>, Seyyal Rota<sup>2</sup>, Kayahan Caglar<sup>3</sup>, Isil Fidan<sup>4</sup>

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- $\beta$ -naphthylamide) in the *A.baumannii* 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- $\beta$ -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

<sup>1</sup> Assistant Professor, Department of Laboratory Sciences, Faculty of Paramedical Sciences, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding Author)

<sup>2</sup> Professor, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Gazi University, Ankara, Turkey

<sup>3</sup> Associate Professor, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Gazi University, Ankara, Turkey

<sup>4</sup> Associate Professor, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Gazi University, Ankara, Turkey