



Investigating the resistance to common antiseptics, Behsadin, Titmate and Damosib in *Pseudomonas aeruginosa* isolates isolated from mastitis milk of Shiraz and Kazerun cows.

Fattahi, H. ^{1*}, shekari, S.², olyaei, A.³, Jouibar, F.⁴

Received: 05.05.2023

Accepted: 19.09.2023

Abstract

The use of breast disinfectants is one of the tools to control the spread of factors involved in mastitis infection, especially *Pseudomonas aeruginosa*.

In this research, 100 samples of bovine mastitis milk were collected from Fars province and Kazerun city, of which 88 were environmental strains and 12 were clinical strains, of which; 8 strains were identified as *P. aeruginosa* from bovine mastitis milk samples in Shiraz and Kazerun regions. Then the antibiogram test was performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) using three disinfectants, Titmit, Behsadin, and Damosib, based on the microdilution method.

Results: *Pseudomonas aeruginosa* strains were 37.5% sensitive and 62.5% resistant, 36% environmental and 64% clinical. In examining the difference between the mean MIC changes of three disinfectants based on the Mann-Whitney U Test, the difference of Behsadin disinfectant MIC changes with other disinfectants was significant ($P \leq 0.05$) the same way, the difference of MIC changes of Titmate disinfectant with two other disinfectants was highly significant ($P \leq 0.01$). The results obtained from the research showed that the concentrations effective in inhibiting the growth of the strains are much lower than the amount recommended by the manufacturing companies. It is believed that the high use of these antimicrobial substances may cause selective pressure and lead to the growth of strains resistant to disinfectants. Also, the efflux pumps involved in resistance, despite the expectation, did not play an effective role in creating resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains, and they confirmed the hypothesis that the resistance created in the studied strains was probably due to other mechanisms.

Keywords: Mastitis, *Pseudomonas aeruginosa*, disinfectants, Behsadin, Titmate, Damosib.

1. Assistant Professor in Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University. Kazerun Branch. Kazerun. Iran.

2. Doctor of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University. Kazerun Branch. Kazerun. Iran.

3. Assistant Professor in Department of parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University. Kazerun Branch. Kazerun. Iran.

4. instructor in Department of physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University. Kazerun Branch. Kazerun. Iran

*Corresponding author: fattahi_h@sums.ac

بررسی مقاومت جدایه های سودوموناس ائروژنز جدا شده از شیرهای ورم پستانی گاو نسبت به ضد عفونی کننده های داموسیپ، تیت میت و بهسادین

فتاحی، ح.*^۱، شکاری، س.^۲، علیایی، ا.^۳، جویبار، ف.^۴

دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۵ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۸

خلاصه

استفاده از ضد عفونی کننده های پستانی یکی از ابزارهای کنترل شیوع عوامل دخیل در عفونت ورم پستان به ویژه سودوموناس ائروژنز است. هدف از این مطالعه تعیین میزان مقاومت سودوموناس ائروژنز به ضد عفونی کننده های رایج در دامداری ها نظیر تیت میت، بهسادین و داموسیپ بود.

در این پژوهش، ۱۰۰ نمونه از شیر از گاوهای مبتلا به ورم پستان در شهرهای شیراز و کازرون جمع آوری شد و پس از کشت بر روی محیط های مک کانکی و ستریومیدآگار از این تعداد؛ ۸ باکتری جدا شده از نمونه های شیر ورم پستانی گاوان منطقه شیراز و کازرون به عنوان سودوموناس ائروژنز تشخیص هویت داده شدند. سپس آزمایش تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) با استفاده از سه ضد عفونی کننده انجام شد. در بررسی اختلاف تغییرات MIC سه ضد عفونی کننده براساس آزمون Mann-Whitney U test بهسادین با ضد عفونی کننده های دیگر معنادار بود ($P < 0.05$)، به همین ترتیب اختلاف تغییرات MIC ضد عفونی کننده تیت میت با دو ضد عفونی کننده دیگر قویا معنادار بود ($P < 0.01$). نتایج به دست آمده از تحقیق نشان دادند غلظت های موثر بر مهار رشد سویه ها بسیار کمتر از میزان توصیه شده توسط شرکت های سازنده است. اعتقاد بر این است که استفاده زیاد از این مواد ضد میکروبی ممکن است باعث فشار انتخابی شده و به رشد گونه های مقاوم در برابر ضد عفونی کننده ها منجر شود.

واژه های کلیدی: ورم پستان، سودوموناس ائروژنز، داموسیپ، تیت میت، بهسادین

۱. گروه میکروبیولوژی، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران
۲. دکترای حرفه ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران
۳. گروه انگل شناسی، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران
۴. گروه فیزیولوژی، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران

*نویسنده مسئول: fattahi_h@sums.ac.ir

مکانیسم های اصلی دفاعی در سودوموناس آئروژنز علیه آنتی بیوتیک ها و مواد ضد عفونی کننده می باشند (Tiwari و همکاران، ۲۰۱۸. Brooks و همکاران، ۲۰۰۴).

مقاومت آنتی بیوتیکی سودوموناس به عوامل مختلفی بستگی دارد که مهمترین آنها وجود پمپ های افلاکس یا تراوشی است و اصلی ترین این پمپ ها، پمپ MexAB-OprM می باشد (Azadpour و همکاران، ۲۰۱۵. Tiwari و همکاران، ۲۰۱۸). افزایش بیان پمپ افلاکس MexAB-oprM باعث تراوش داروی وارد شده، به خارج از سلول می شود و در نتیجه باعث مقاومت سودوموناس آئروژنز به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها شامل بتالاکتام ها (باستثنای ایمی پنم)، کینولون ها، تتراسیکلین، ماکرولیدها، کلرامفنیکل، نوبیوسین، تری متوپریم و سولفامتوکسازول می شود (Afsharivari و همکاران، ۱۳۹۸. Dostundi و همکاران، ۲۰۱۲. Azadpour و همکاران، ۲۰۱۵. Tiwari و همکاران، ۲۰۱۸). پمپ های انتقال دهنده آنتی بیوتیک هایی از گروه های متفاوت می توانند با مقاومت دارویی چندگانه مرتبط باشند. پمپ های افلاکس چندگانه از لحاظ بالینی خطرناک محسوب می شوند زیرا کسب کردن و داشتن آنها موجب کاهش حساسیت ارگانیزم به طیف وسیعی از مواد می شود و در نتیجه انتخاب داروی موثر را با مشکل مواجه می نماید. (Brown و همکاران، ۱۹۶۵).

در حال حاضر ترکیبات ضد عفونی کننده متعددی در بازار موجود می باشند که با اهداف متفاوتی به کار گرفته می شوند. برخی از این ترکیبات شیمیایی از اثرات سمی برخوردارند. متداولترین نوع ضد عفونی کننده ها در دامپزشکی مواد شیمیایی هستند. در سال های اخیر در برخی از کشورها ضد عفونی با استفاده از آئروسول ها بخصوص در مرغداری ها و دامداری های مدرن مورد مصرف گسترده ای پیدا کرده است، البته روش های فیزیکی ضد عفونی مانند استفاده از دمای بالا، پرتوهای یونیزه کننده و نور خورشید نیز از اهمیت برخوردارند. تمام تجهیزات، خطوط و سطوح ظروف شیردوشی که با شیر، کثیفی یا کود در تماس هستند باید قبل از شیردوشی بعدی کاملاً تمیز و ضد عفونی شوند. در یک دامداری، ضد عفونی دستگاه شیردوشی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. هدف از شستشو و ضد عفونی دستگاه شیردوشی، از بین بردن میکروارگانیزم های باقیمانده موجود در داخل دستگاه با فاصله قبل از شیردوشی است. نظافت یا ضد عفونی ناکافی یا نامناسب موجب می شود تا باکتری ها روی سطوح تجهیزات باقی بمانند، رشد کنند و تکثیر شوند. این منجر به افزایش تعداد باکتری ها در شیر می شود. در این مقاله به بررسی روش های گندزدایی و ضد عفونی دستگاه

سودوموناس باکتری گرم منفی، میله ای، هوازی، بدون اسپور، متحرک با تاژک قطبی، اکسیداز و کاتالاز مثبت است که قادر به رشد در محیط های ساده می باشد. (Afsharivari و همکاران، ۱۳۹۸. Dostundi و همکاران، ۲۰۱۲. Fattahi و همکاران، ۱۴۰۰) سودوموناس ها با سیل های گرم منفی، هوازی و متحرک هستند و برخی از آنها رنگدانه های محلول در آب تولید می کنند. سودوموناس ها به طور وسیعی در خاک، آب، گیاهان و حیوانات وجود دارند (Fattahi و همکاران، ۱۴۰۰. Japoninejad و همکاران، ۲۰۱۳. Adewoye و همکاران، ۲۰۰۲).

سودوموناس آئروژنز باکتری پاتوژن فرصت طلب گرم منفی است دارای لیپو پلی ساکراید، تاژک قطبی و پیلی بوده، این عوامل مسئول حرکت و چسبیدن باکتری به غشای سلولی بیولوژیکی بوده به عنوان عامل بیماری زایی این باکتری در مورد بیماران سوختگی دارای نقش مهمی هستند (Larry و همکاران، ۱۳۸۷. Ali و همکاران، ۲۰۱۴) سودوموناس آئروژنز از مهمترین پاتوژن های فرصت طلب بوده که تمایل ویژه ای به محیط های مرطوب داشته و به طور وسیع در خاک، آب، گیاهان، کود و پوست حیوانات یافت می شود. علاوه بر این گاهی در گوش خارجی، دستگاه تنفسی فوقانی و روده ی بزرگ اشخاص سالم نیز حضور داشته و موجب بیماری های مختلفی در انسان و دام از جمله عفونت های ادراری، پنومونی مزمن در بیماران سیستمیک فیبروزیس، عفونت چشم، گوش، عفونت زخم و ورم پستان می گردد (Azadpour و همکاران، ۲۰۱۵. Chapman و همکاران، ۲۰۰۳. Brown و همکاران، ۱۹۶۵). در دام ها این باکتری از عوامل بیماری زای مقاوم به درمان می باشد که ضررهای اقتصادی بالایی را به صنعت دامپروری وارد می کند. سودوموناس آئروژنز به عنوان یکی از عوامل ایجادکننده ورم پستان های کلینیکی با شیوع ناگهانی در گاوهای شیری مطرح می باشد (Taheri و همکاران، ۱۳۸۹. Bialvaei و همکاران، ۲۰۱۷. Bolt و همکاران، ۲۰۰۸).

توسعه مقاومت آنتی بیوتیکی خصوصاً مقاومت به آمینوگلیکوزیدهایی که با واسطه ی پلاسمید عمل می کنند سریعاً باعث انتقال ژن مقاومت به سودوموناس های حساس و سایر باکتری های گرم منفی گردیده و ارگانیزم را نسبت به درمان مقاوم می کنند (Coyne و همکاران، ۲۰۱۱. Thomas و همکاران، ۲۰۱۱). جدایه های وحشی این باکتری دارای مقاومت ذاتی به انواع مختلف آنتی بیوتیک ها است این خصوصیت در ارتباط با ناتراوایی غشای خارجی و فعالیت پمپ های افلاکس است. پمپ های افلاکس با ویژگی چندگانه

شیردوشی با تمرکز بر روی سه ماده پر استفاده در دامداری‌ها (تیت میت، بهسادین و داموسیب) پرداخته می‌شود. (Coyne و همکاران، ۲۰۱۱. Thomas و همکاران، ۲۰۱۱. Chapman و همکاران، ۲۰۰۳)

مواد و روش کار

جامعه نمونه گیری

در این پژوهش، ۱۰۰ نمونه از شیر از گاوهای مبتلا به ورم پستان در شهرهای شیراز و کازرون جمع آوری شد. و مورد بررسی قرار گرفتند. از میان ۱۰۰ ایزوله جمع آوری شده از گاوداری‌های منتخب، ۸۸ نمونه مربوط به بیماری‌های تحت بالینی (جدایه محیطی) و ۱۲ جدایه دارای علائم بارز ورم پستان (بالینی) بودند. نمونه‌ها ابتدا روی محیط‌های کشت نوترینت آگار، آگار خوندار، مک کانکی آگار و ستریمیدآگار کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C گرماگذاری شدند. بعد از رشد باکتری پلیت‌های حاوی کلنی‌های مشکوک به سودوموناس جدا و تست‌های بیوشیمیایی از قبیل تست اکسیداز، کاتالاز، تست O/F، تست حرکت و تولید اندول در محیط کشت SIM، تست MR/VP، واکنش در محیط کشت TSI، رشد در دمای 42°C درجه سانتی‌گراد و وجود رنگدانه برای آنها گذاشته شد که در نهایت ۸ جدایه به عنوان سودوموناس ائروژنز تشخیص هویت داده شدند و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه منتقل شدند. برای تهیه استوک فریزری و استفاده مجدد از نمونه‌ها، ابتدا کشت خطی تهیه کرده و در صورت اطمینان از خالص بودن آن، کلنی‌ها را توسط لوب به ویال‌های حاوی محیط نوترینت برات دارای ۱۲٪ گلیسرول منتقل کرده و پس از ورتکس در دمای 20°C - نگهداری می‌کنیم. (Fattahi و همکاران، ۱۴۰۰، Daury و همکاران، ۲۰۱۶. De Lorenzo و همکاران، ۱۹۹۰)

در پژوهش حاضر سه ضد عفونی کننده شیمیایی رایج موجود در بازار که در ضد عفونی کردن پستان و شیردوشی کاربرد دارند نظیر داموسیب، تیت میت و بهسادین مورد استفاده قرار گرفتند. (این مواد بصورت تصادفی انتخاب شدند). به منظور تیمار جدایه‌ها با ضد عفونی کننده‌های مذکور، رقیق‌سازی با آب مقطر با مقادیر مختلف صورت گرفت تا میزان اثر بخشی هر یک از رقت‌های تهیه شده بر سوبه‌ها با معیار MIC سنجیده شود.

برای تعیین میزان MIC ضد عفونی کننده‌های ۳ گانه (داموسیب، تیت میت، بهسادین) میکروپلیت ۹۶ چاهکی، با تنظیم رقت‌های ۲ برابری هر چاهک نسبت به چاهک قبلی

مورد استفاده قرار گرفت. برای هر ایزوله یک ردیف پلیت شامل ۸ چاهک رقت‌های سریالی و دو چاهک کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شد. (در مجموع ۱۰ چاهک). (Dijun Du و همکاران، ۲۰۱۸. Driscoll و همکاران، ۲۰۰۷) در هر پلیت ۹۶ چاهکی، برای هر ایزوله سه ردیف چاهک برای تزریق رقت‌های سریالی ۳ ضد عفونی کننده، مورد استفاده قرار گرفت. ۸ چاهک ردیف اول برای هر جدایه به ضد عفونی کننده داموسیب، ردیف دوم به ضد عفونی کننده تیت میت و ردیف سوم به ضد عفونی کننده بهسادین تعلق گرفت. دو چاهک انتهایی هر ردیف در میکروپلیت برای کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شدند. در چاهک کنترل مثبت، سوسپانسیون محلول در محیط مولر هیتون برات حاوی جدایه استاندارد سودوموناس ائروژنز ATCC 85327 اما عاری از ضد عفونی کننده تزریق شد. محتوای چاهک کنترل منفی محیط مولر هیتون برات استریل و بدون باکتری بود. رقت‌های (غلظت‌ها) سریالی به ترتیب حاوی غلظت‌های ۲،۵٪، ۱،۲۵٪، ۰،۶۲۵٪، ۰،۳۱۲٪، ۰،۱۵۶٪، ۰،۰۷۸٪، ۰،۰۳۹٪، ۰،۰۱۹۵٪ برای ضد عفونی کننده داموسیب، غلظت‌های ۵٪، ۲،۵٪، ۱،۲۵٪، ۰،۶۲۵٪، ۰،۳۱۲٪، ۰،۱۵۶٪، ۰،۰۷۸٪، ۰،۰۳۹٪ برای ضد عفونی کننده تیت میت، و غلظت‌های ۱۰۰٪، ۵۰٪، ۲۵٪، ۱۲،۵٪، ۶،۲۵٪، ۳،۱۲۵٪، ۱،۶۲۵٪، ۰،۸۱٪ برای ضد عفونی کننده بهسادین، در تیوپ‌های ۲CC تهیه شدند. رقت‌های مورد نظر برای هر ضد عفونی کننده، با استفاده از مقادیر مذکور در مقالات و پس از راه اندازی بر اساس آزمایش‌های متعدد، انتخاب شدند. میکروپلیت‌ها پس از تزریق سوسپانسیون میکروبی و ضد عفونی کننده‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت، میکروپلیت‌ها مورد بازبینی قرار گرفتند و میزان MIC برای هر یک از ضد عفونی کننده‌ها تعیین شد. برای تعیین میزان حداقل کشندگی باکتری یا MBC پس از بررسی میکروپلیت ۹۶ خانه و تعیین چاهک‌های MIC، از این چاهک‌ها و خانه‌های شفاف در هر ردیف، ۳۰ میکرولیتر برداشت شده و به پلیت‌های ۶ سانتی متری حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار (شرکت مرک آلمان) منتقل و با استفاده از پیپت پاستور شیشه‌ای بر روی محیط پخش شد. سپس پلیت‌ها برای ۱۸-۲۴ ساعت در انکوباتور 37°C درجه قرار گرفتند. پلیت‌ها پس از این مدت مورد بررسی قرار گرفتند تا غلظت MBC برای ضد عفونی کننده‌ها محاسبه گردد.

آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS 26.0 انجام شد. شاخص هایی نظیر میانگین و انحراف معیار به عنوان نتایج توصیفی محاسبه شدند. برای مقایسه بین گروه های مختلف، از آزمون های غیر پارامتریک نظیر Mann Whitney Utest استفاده شد. سطح معنی داری کمتر از 0/05 معنی دار در نظر گرفته شد. نمودارها با نرم افزار Microsoft Excel ترسیم شد. (Younes-Caute و همکاران، ۱۹۹۸)

نتایج

در تحقیق حاضر بررسی میکروپلیت های ۹۶ خانه موقعیت چاهک های رشد یافته و بدون رشد نشان دهنده این واقعیت بود که در مورد ضدعفونی کننده های تیت میت (TM) و بهسادین (B) غلظت های زیاد، مانع رشد جدایه ها شدند و

کدورت چاهک ها در غلظت های پایین اتفاق افتاده است. اما در مورد ضدعفونی کننده داموسیپ (D) نتایج بر عکس است به این مفهوم که غلظت های زیاد داموسیپ مانع رشد جدایه ها نمی شوند و در بیش از ۹۰٪ جدایه ها عدم رشد در رقت ششم و رقت های بعد از آن به وقوع می پیوندد و در ۵ غلظت اول این ضدعفونی کننده، در چاهک ها کدورت (رشد باکتری) دیده می شود (جدول ۳-۱). غلظت مورد استفاده برای هریک از ضدعفونی کننده ها بر اساس سفارش شرکت سازنده به ترتیب ۲٪ برای داموسیپ، ۱۰۰٪ برای تیت میت و ۱۰۰٪ برای بهسادین پیشنهاد شده است. غلظت مصرفی در این مطالعه پس از بهینه سازی بر اساس آزمایشات و توجه به سایر مطالعات تهیه و استفاده شدند و میزان MIC و MBC بر اساس آنها به دست آمد. (جدول ۳-۲).

جدول ۳-۱- رقت‌های سریالی ضد عفونی کننده‌های سه گانه برای تعیین MIC

غلظت‌های سریالی (%) هر یک از ضد عفونی کننده ها برای تعیین MIC	غلظت مصرفی رایج*	ضد عفونی کننده							
		۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
	-	-	-	۳	۴	۵	۶	۷	۸
D	۲(%)	۲,۵	۱,۲۵	۰,۶۲	۰,۳۱	۰,۱۵	۰,۰۷	۰,۰۳	۰,۰۱
TM	۱۰۰(%)	۵	۲,۵	۱,۲۵	۰,۶۲	۰,۳۱	۰,۱۵	۰,۰۷	۰,۰۳
B	۱۰۰(%)	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲,۵	۶,۲۵	۳,۱۲	۱,۵۶	۰,۷۸

* غلظت مورد مصرف به پیشنهاد شرکت سازنده. تیت میت (TM)، بهسادی (B)، داموسی (D)

جدول ۳-۲- MIC و MBC هر یک از ضد عفونی کننده ها در ایزوله های سودوموناس اتروژنر

غلظت (%) ضد عفونی کننده ها	حداقل MIC	حداکثر MIC	محدوده غلظت	فراوانترین MIC (درصد فراوانی)	حداکثر MIC	حداقل MIC	فراوانترین MBC (درصد فراوانی)
							حداکثر MBC
داموسی	۰,۰۷۸	۰,۱۵	۲,۵-۰,۱۹	۰,۰۷۸ (۸۲,۷)	۰,۱۵	۰,۰۷۸	۰,۰۷۸ (۸۲,۷)
تیت میت	۰,۱۵	۰,۶	۵-۰,۳۹	۰,۳ (۴۸,۲)	۰,۶	۰,۱۵	۰,۳ (۳۸)
بهسادی	۳,۱۲	۲۵	۱۰۰-۰,۷۸	۱۲,۵ (۵۸,۶)	۲۵	۳,۱۲	۱۲,۵ (۵۸,۶)

در این جدول کمترین و بیشترین مقدار MIC و کمترین و بیشترین MBC مربوط به هر یک از ضد عفونی کننده ها بر حسب درصد درج شده است. همچنین محدوده غلظت سریالی تهیه شده برای هر ضد عفونی کننده و نیز پر تکرارترین غلظت MIC و MBC و سهم آن در بین کل سویه ها بر حسب درصد مشخص شده است. چنانکه ملاحظه می گردد، در ضد عفونی کننده داموسی بیش از ۸۲٪ نمونه ها دارای MIC و MBC معادل ۰,۰۸۷٪ بودند که درصد نسبتاً قابل توجهی است. همچنین در ضد عفونی کننده بهسادی حدود ۶۰٪ از سویه ها دارای MIC و MBC معادل ۱۲,۵٪ بودند. از سوی دیگر همسانی غلظت MIC و MBC در هر سه ضد عفونی کننده نشان دهنده خاصیت باکتریسیدال ضد عفونی کننده ها در ایزوله ها سودوموناس اتروژنراست اگر این خصوصیت در مورد تیت میت در تعداد کمتری از سویه ها مصداق داشته است.

جدول ۳-۳- میزان MIC و MBC سویه در ضد عفونی کننده های سه گانه (بر حسب درصد)

ضد عفونی کننده ها	داموسیپ		تیت میت		بهسادین	
	MIC (%)	MBC (%)	MIC (%)	MBC (%)	MIC (%)	MBC (%)
سویه ها						
۱	۰,۰۷۸	۰,۰۷۸	۰,۱۵	۰,۶	۱۲,۵	۱۲,۵
۲	۰,۰۷۸	۰,۰۷۸	۰,۳	۰,۶	۱۲,۵	۱۲,۵
۳	۰,۰۷۸	۰,۰۷۸	۰,۱۵	۰,۱۵	۱۲,۵	۱۲,۵
۴	۰,۰۷۸	۰,۰۷۸	۰,۳	۰,۳	۱۲,۵	۱۲,۵
۵	۰,۰۷۸	۰,۰۷۸	۰,۱۵	۰,۱۵	۱۲,۵	۱۲,۵
۶	۰,۰۷۸	۰,۰۷۸	۰,۳	۰,۳	۲۵	۲۵
۷	۰,۱۵	۰,۱۵	۰,۱۵	۰,۱۵	۲۵	۲۵
۸	۰,۰۷۸	۰,۰۷۸	۰,۶	۱,۲۵	۲۵	۳,۱۲
کنترل	۰,۳	۰,۳	۰,۳	۰,۳	۲۵	۲۵

جدول ۳-۴- تعداد سویه در MICهای مشخص های شده و غلظت مواد ضد عفونی کننده در MIC50 و MIC90 تیت میت (TM)، بهسادین (B)، داموسیپ (D)

ضد عفونی کننده ها	غلظت مصرفی رایج	تعداد سویه ها در MICهای مشخص شده								MIC50	MIC90
		۲,۵	۰,۱۲۵	۰,۶۲	۰,۳۱	۰,۱۵	۰,۰۷	۰,۰۳	۰,۰۱		
D	۲٪	۰	۰	۰	۰	۴	۴	۰	۰	۰,۰۷	۰,۱۵
		تعداد سویه ها در MICهای مشخص شده								MIC50	MIC90
TM	۱۰۰٪ (بدون رقیق سازی)	۵	۲,۵	۱,۲۵	۰,۶۲	۰,۳۱	۰,۱۵	۰,۰۷	۰,۰۳	MIC50	MIC90
		۰	۰	۰	۱	۴	۳	۰	۰	۰,۳۱	۰,۶۲
		تعداد سویه ها در MICهای مشخص شده								MIC50	MIC90
B	۱۰۰٪ (بدون رقیق سازی)	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲,۵	۶,۲۵	۳,۱۲	۱,۵۶	۰,۷۸	MIC50	MIC90
		۰	۰	۲	۵	۰	۱	۰	۰	۱۲,۵	۲۵

پس از تیمار سوسپانسیون میکروبی با غلظت های ۸ گانه و تعیین MIC همه نمونه ها در هر سه ضد عفونی کننده، فراوانی سویه ها در MICهای معین شده مورد شمارش قرار گرفت. سپس برای به دست آوردن معیار حساسیت سویه ها، غلظت ضد عفونی کننده در MIC50 و MIC90 محاسبه گردید.

جدایه های حساس و مقاوم در هر ضد عفونی کننده بر اساس MIC به دست آمده تعیین شدند. برآیند کلی حساسیت، بر اساس سنجش حساس یا مقاوم بودن جدایه ها نسبت به هر سه ضد عفونی کننده، تعیین شد با این توضیح که جدایه هایی که حداقل نسبت به یک ضد عفونی کننده مقاوم بودند به طور کلی مقاوم در نظر گرفته شدند. یک جدایه (۱۲/۵٪) از مجموع جدایه ها به دو ضد عفونی

کننده، و ۲ جدایه (۲۵٪) به یکی از ضد عفونی کننده ها مقاوم بودند. پنج جدایه باقی مانده (۶۲/۵٪) نسبت به هر سه ضد عفونی کننده حساس بودند (جدول ۳-۵)

جدول ۳-۵- میزان MIC و محدوده حساسیت ایزوله‌های سودوموناس اثرورزدر سه ضد عفونی کننده سویه‌های مشخص شده با رنگ متفاوت محیطی هستند.

ضد عفونی کننده‌ها	داموسیپ		بهسادین		تیت میت		برآیند کلی حساسیت
	MIC (%)	حساس / مقاوم	MIC (%)	حساس / مقاوم	MIC (%)	حساس / مقاوم	
جدایه ها							
۱	۰,۰۷۸	حساس	۰,۱۵	حساس	۱۲,۵	حساس	حساس
۲	۰,۰۷۸	حساس	۰,۳	حساس	۱۲,۵	حساس	حساس
۳	۰,۰۷۸	حساس	۰,۱۵	حساس	۱۲,۵	حساس	حساس
۴	۰,۰۷۸	حساس	۰,۳	حساس	۱۲,۵	حساس	حساس
۵	۰,۰۷۸	حساس	۰,۱۵	حساس	۱۲,۵	حساس	حساس
۶	۰,۰۷۸	حساس	۰,۱۵	حساس	۲۵	مقاوم	مقاوم
۷	۰,۱۵	مقاوم	۰,۳	حساس	۲۵	مقاوم	مقاوم
۸	۰,۰۷۸	حساس	۰,۶	حساس	۲۵	مقاوم	مقاوم

ضد عفونی کننده	حساس	مقاوم
	تعداد (درصد)	
داموسیپ	۷ (۸۷/۵٪)	۱ (۱۲/۵٪)
تیت میت	۵ (۶۲/۵٪)	۳ (۳۷/۵٪)
بهسادین	۸ (۱۰۰٪)	۰ (۰٪)

چنانکه ملاحظه می‌گردد بیشترین درصد حساسیت جدایه‌ها نسبت به ضدعفونی‌کننده بهسادیین ایجاد شده است و دو ضدعفونی‌کننده داموسیپ و تیت میت به ترتیب در رتبه دوم و سوم قرار دارند. بر همین مبنا، بیشترین درصد مقاومت جدایه‌ها نسبت به ضدعفونی‌کننده تیت میت ایجاد شده است و دو ضدعفونی‌کننده داموسیپ و بهسادیین به ترتیب در رده دوم و سوم قرار دارند. با وجود بیشتر بودن درصد حساسیت در مقایسه با درصد مقاومت در هر یک از ضدعفونی‌کننده‌ها به تنهایی، اما بر مبنای معیار تعیین حساسیت کل، درصد جدایه‌های حساس در مجموع کمتر از درصد جدایه‌های مقاوم است.

میانگین تغییرات MIC و MBC سه ضدعفونی‌کننده مورد بررسی در هر یک از ۸ نمونه سودوموناس ائروژنز مورد تحلیل قرار گرفت. میانگین MIC ضدعفونی‌کننده داموسیپ در جدایه‌های مورد مطالعه ۱۶/۶۲، تیت میت ۰/۱۹ و بهسادیین ۰/۲۸ محاسبه شد.

ارتباط بین تغییرات MIC سه ضدعفونی‌کننده در ایزوله‌های سودوموناس ائروژنز با آزمون همبستگی پیرسون مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که ارتباط بین MIC ضدعفونی‌کننده‌های D و TM، با $(r=-0.159)$ و $(P=0.420)$ ، ارتباط بین MIC ضد عفونی‌کننده‌های D و B، با $(r=-0.108)$ و $(P=0.585)$ و ارتباط بین MIC

ضد عفونی‌کننده‌های TM و B، با $(r=-0.8)$ و $(P=0.687)$ ، ضعیف و در جهت عکس یکدیگر است.

همچنین اختلاف بین تغییرات MIC سه ضدعفونی‌کننده در ایزوله‌های سودوموناس ائروژنز با آزمون Mann Whitney U Test مورد بررسی قرار گرفت؛ بر این اساس بین MIC ضدعفونی‌کننده داموسیپ و سایر ضدعفونی‌کننده‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. $(P=0.47)$ بین میانگین MIC ضدعفونی‌کننده تیت میت نسبت به سایر ضدعفونی‌کننده‌ها اختلاف معنی‌دار بود. $[P=0.019] p<0.05$ بین میانگین MIC ضدعفونی‌کننده بهسادیین نسبت به سایر ضدعفونی‌کننده‌ها اختلاف معنی‌دار بود $[P=0.006] p<0.01$.

از سوی دیگر ارتباط بین تغییرات MBC سه ضدعفونی‌کننده در ایزوله‌های سودوموناس ائروژنز با آزمون همبستگی پیرسون مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که ارتباط بین MBC ضدعفونی‌کننده‌های D و TM با $(r=-0.261)$ و $(P=0.18)$ ، ضعیف و عکس یکدیگر، ارتباط بین MBC ضدعفونی‌کننده‌های D و B، با $(r=0.332)$ و $(P=0.085)$ ، متوسط و مثبت، و ارتباط بین MBC ضدعفونی‌کننده‌های TM و B، با $(r=-0.094)$ و $(P=0.636)$ ، ضعیف و عکس یکدیگر است.

جدول ۳-۶- توزیع فراوانی مطلق و نسبی جدایه ها بر حسب منشاء جدا سازی، به تفکیک حساسیت/ مقاومت به ضد عفونی کننده ها

	محیطی	بالینی	مجموع
حساس	۷ ٪۳۵	۱۳ ٪۶۵	۲۰ ٪۸۳/۳
مقاوم	۱ ٪۲۵	۳ ٪۷۵	۴ ٪۲۰/۸۳
مجموع	۸ ٪۳۶	۱۶ ٪۶۴	۲۴ ٪۱۰۰

بین نسبت جدایه‌های حساس به مقاوم در ایزوله‌های بالینی و محیطی سودوموناس/اثرورنتر، بر اساس آزمون Chi-Square اختلاف معنی داری وجود نداشت (P=0.611)

بحث

در این مطالعه که براساس چگونگی واکنش سودوموناس/اثرورنتر به برخی از ضد عفونی کننده های پستانی موجود در بازار ایران انجام گردید به بررسی اثر سه ضد عفونی کننده داموسیپ، تیت میت و بهسادیین بر نوع واکنش حساسیت میکروبی (که با فاکتور MIC نشان داده می شود) پرداخته شد. غلظت سه ماده ضد عفونی کننده مورد استفاده در این مطالعه با در نظر گرفتن غلظت توصیه شده شرکت سازنده به علاوه استفاده از تجربه سایر محققان تهیه گردید.

آنچه در مورد هر سه ماده ضد عفونی کننده حائز اهمیت است این است که غلظت موثر آنها با غلظت توصیه شده توسط تولید کننده، برای کنترل جدایه های مورد مطالعه منطبق نبود با این توضیح که ضد عفونی کننده های تیت میت و بهسادیین که محلول های آماده مصرف اند و نیازی به رقیق سازی ندارند در غلظت های کمتر از غلظت توصیه شده نیز منجر به مهار رشد یا مرگ باکتری ها می شدند. (Gomaa و همکاران، ۲۰۱۸. Fendrich و همکاران، ۱۹۸۸. Hancock و همکاران، ۱۳۹۸. Giamarellou، ۲۰۰۲)

حد اکثر غلظت مؤثر بر مهار رشد در ضد عفونی کننده بهسادیین غلظت ۲۵٪ (غلظت توصیه شده = ۱۰۰٪) و در تیت میت ۰.۶٪ (غلظت توصیه شده = ۱۰۰٪) بود. همین مورد در مورد MBC نیز صادق بود، و غلظت باکتریسیدال ضد عفونی کننده ها در مورد همه ایزوله ها پایین تر از حد توصیه شده بود. (Gomaa و همکاران، ۲۰۱۸)

اسداللهی و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه تأثیر ضد عفونی کننده های بیمارستانی بر استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس اذعان کردند که غلظت MIC به دست آمده در مطالعه آنها ۸ برابر، در مورد

در مطالعه نوروژی و همکاران، تمام ایزوله های سودوموناس/اثرورنتر در برابر غلظت های توصیه شده ضد عفونی کننده های نانوسیل و ایا مقاوم بودند. (نوروژی و همکاران، ۱۳۹۷)

به نظر می رسد اختلاف غلظت مؤثر ضد عفونی کننده ها به تفاوت نوع آنها یا تفاوت در گونه های تیمار شده بستگی دارد. (بیسواس و همکاران، ۲۰۱۸. اسداللهی و همکاران، ۲۰۱۸. لانجری و همکاران، ۲۰۱۷)

اگرچه می توان تصور کرد که غلظت توصیه شده توسط سازنده، مبتنی بر جامع نگری نسبت به همه عوامل عفونت دهنده است، نه برای مهار گونه خاصی از عوامل

در این مطالعه که براساس چگونگی واکنش سودوموناس/اثرورنتر به برخی از ضد عفونی کننده های پستانی موجود در بازار ایران انجام گردید به بررسی اثر سه ضد عفونی کننده داموسیپ، تیت میت و بهسادیین بر نوع واکنش حساسیت میکروبی (که با فاکتور MIC نشان داده می شود) پرداخته شد. غلظت سه ماده ضد عفونی کننده مورد استفاده در این مطالعه با در نظر گرفتن غلظت توصیه شده شرکت سازنده به علاوه استفاده از تجربه سایر محققان تهیه گردید.

آنچه در مورد هر سه ماده ضد عفونی کننده حائز اهمیت است این است که غلظت موثر آنها با غلظت توصیه شده توسط تولید کننده، برای کنترل جدایه های مورد مطالعه منطبق نبود با این توضیح که ضد عفونی کننده های تیت میت و بهسادیین که محلول های آماده مصرف اند و نیازی به رقیق سازی ندارند در غلظت های کمتر از غلظت توصیه شده نیز منجر به مهار رشد یا مرگ باکتری ها می شدند. (Gomaa و همکاران، ۲۰۱۸. Fendrich و همکاران، ۱۹۸۸. Hancock و همکاران، ۱۳۹۸. Giamarellou، ۲۰۰۲)

حد اکثر غلظت مؤثر بر مهار رشد در ضد عفونی کننده بهسادیین غلظت ۲۵٪ (غلظت توصیه شده = ۱۰۰٪) و در تیت میت ۰.۶٪ (غلظت توصیه شده = ۱۰۰٪) بود. همین مورد در مورد MBC نیز صادق بود، و غلظت باکتریسیدال ضد عفونی کننده ها در مورد همه ایزوله ها پایین تر از حد توصیه شده بود. (Gomaa و همکاران، ۲۰۱۸)

اسداللهی و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه تأثیر ضد عفونی کننده های بیمارستانی بر استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس اذعان کردند که غلظت MIC به دست آمده در مطالعه آنها ۸ برابر، در مورد

عفونت زا مانند سودوموناس ائروژنز در ضد عفونی کننده داموسیپ، نه تنها غلظت مؤثر آن با غلظت توصیه شده متفاوت بود، بلکه برخلاف دو ضد عفونی کننده دیگر، غلظت مورد نظر شرکت سازنده شرایط خوبی برای رشد ایزوله ها فراهم کرد بنابراین به منظور ممانعت از رشد باکتری، این محلول بیش از مقدار توصیه شده رقیق گردید. غلظت توصیه شده برای این محلول ۲٪ است، اما، بیش از ۸۰٪ از جدایه های مورد مطالعه در غلظت ۲٫۵٪ تا ۰٫۱۵٪ شد نشان دادند. این امکان وجود دارد که ضد عفونی کننده های بیمارستانی مطابق با استانداردهای اروپایی تهیه شده و با ماهیت و شکل توزیع عوامل عفونی در ایران مطابقت نداشته باشند. در تحقیق حاضر، MIC و MB به دست آمده در دو ضد عفونی کننده داموسیپ و بهسادین، در همه ایزوله ها برابر بودند. برابری نسبی MIC و MBC و همچنین MICهای کمتر از غلظت توصیه شده در هر سه ضد عفونی کننده، نشانگر خاصیت باکتریسیدال آنها در دوز استاندارد است و قدرت و اثربخشی مواد ضد عفونی کننده مورد استفاده را تایید می کند. (بیسواس و همکاران، ۲۰۱۸، اسداللهی و همکاران، ۲۰۱۸، لانجری و همکاران، ۲۰۱۷)

در این مطالعه، حساسیت و مقاومت جدایه ها بر مبنای تعیین MIC50 و MIC90 محاسبه شد. بر این اساس، جدایه های با غلظت MIC منطبق بر MIC50 و کمتر از آن به عنوان جدایه های حساس به ضد عفونی کننده ها، و جدایه های حاوی غلظت MIC برابر با MIC90 و بیشتر از آن به عنوان جدایه های مقاوم در نظر گرفته شدند. همچنین، جدایه هایی که حداقل به یک ماده ضد عفونی کننده مقاوم بودند، به طور کلی مقاوم محسوب شدند. (نوروزی و همکاران، ۱۳۹۷). پس از تعیین معیار حساسیت ۸۷/۵٪ از جدایه ها به داموسیپ، ۶۲/۵٪ به تیت میت و ۱۰۰٪ به بهسادین حساس بودند و ۱۲/۵٪ از جدایه ها به داموسیپ، ۳۷/۵٪ به تیت میت مقاوم برآورد شدند و هیچ نمونه ای به بهسادین مقاوم نبودند که از این تعداد ۳۷/۵٪ ورم پستان محیطی و ۶۲/۵٪ ورم پستان بالینی بودند. میزان MIC و MBC می تواند به ویژگی های جدایه ها، شرایط استفاده از مواد ضد عفونی کننده و همچنین ترکیبات تشکیل دهنده آنها بستگی داشته باشد. (Guerra-Santos و همکاران، ۱۹۸۶، Guoyan Wu و همکاران، ۲۰۱۵)

تغییرات MIC سه ضد عفونی در ایزوله های سودوموناس ائروژنز با آزمون همبستگی پیرسون مورد مقایسه قرار گرفت و نتایج نشان داد که ارتباط بین MIC سه ضد عفونی کننده معنی دار نیست. همچنین در بررسی MBC سه

ضد عفونی کننده نیز مشخص گردید که ارتباط بین MBC ضد عفونی کننده های داموسیپ و بهسادین ($R=0.332$) و ($P=0.085$) مثبت و متوسط بود. همچنین اختلاف میانگین MIC سه ضد عفونی کننده بر اساس آزمون من ویتنی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که اختلاف تغییرات MIC داموسیپ نسبت به دو ضد عفونی کننده دیگر معنی دار نیست ($P=0.47$) اما اختلاف تغییرات MIC تیت میت و سایر مواد ضد عفونی کننده معنی دار است. ($P<0.05$) به همین ترتیب، اختلاف معنی داری بین تغییرات MIC ضد عفونی کننده بهسادین و دو ضد عفونی کننده دیگر وجود داشت. ($P<0.01$) طبق این اطلاعات، مقدار مقاومت به بهسادین به طور قابل توجهی بالاتر از دو ضد عفونی کننده دیگر بود. اختلاف معنی دار ضد عفونی کننده های مذکور بر اساس آزمون من ویتنی، با توجه به شرایط تقریباً یکسان استفاده از آنها می تواند به عدم شباهت ساختار شیمیایی محلول های مورد استفاده مرتبط باشد.

در بررسی های انجام شده در این مطالعه، بین نسبت جدایه های حساس به مقاوم در ایزوله های بالینی و محیطی سودوموناس ائروژنز بر اساس آزمون کای اسکور اختلاف معنی داری وجود نداشت ($P=0.611$).

از ۸ جدایه مورد مطالعه در سه سری ۸ تکراره برای سه ماده ضد عفونی کننده؛ ۲۰ جدایه (۸۳/۳٪) حساس و ۴ جدایه (۱۶/۷٪) مقاوم بودند. از بین جدایه های حساس، ۷ جدایه (۳۵٪) محیطی و ۱۳ جدایه (۶۵٪) بالینی و از بین جدایه های مقاوم، ۲ جدایه (۵۰٪) محیطی و ۲ جدایه (۵۰٪) بالینی بودند. بر اساس این اطلاعات، فراوانی ایزوله های حساس در هر سه ضد عفونی کننده، در جدایه های بالینی بیش از جدایه های محیطی بود. بیشترین فراوانی حساسیت با ۱۰۰٪ مربوط به بهسادین و کمترین فراوانی حساسیت به ضد عفونی کننده تیت میت با ۶۲/۵٪ مرتبط بود. طبق این اطلاعات، درصد جدایه های مقاوم در ایزوله های محیطی از ایزوله های بالینی بالاتر است. ممکن است علت، این باشد که جدایه های محیطی بیشتر از جدایه های بالینی در معرض مواد ضد عفونی کننده قرار دارند.

با این حال، در مطالعه لانجری و همکاران، جدایه های بالینی در برابر ضد عفونی کننده ها مقاوم تر از جدایه های محیطی بودند. (لانجری و همکاران، ۲۰۱۷)

دلیل تفاوت در نتایج می تواند به نابرابری شرایط آزمایش مانند اقلیم جغرافیایی، نوع ضد عفونی کننده ها، مقاومت بیمار و نحوه استفاده از ضد عفونی کننده ها مربوط باشد. بر اساس برخی مطالعات، اثر بخشی یک روش ضد عفونی به زمان تماس، دما، غلظت ماده فعال و ماندگاری ماده ضد عفونی کننده (Gomaa)

و همکاران، ۲۰۱۸. Tiwari و همکاران، ۲۰۱۸) و شکل حضور ایزوله در محیط (بیوفیلیم یا پلانکتون) (Azadpour و همکاران، ۲۰۱۵. Fattahi و همکاران، ۱۴۰۰) بستگی دارد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه گرچه نشان داد که غلظت‌های مؤثر ضد عفونی کننده های مورد بررسی در مهار رشد جدایه های سودوموناس / ائروژنرکتر از مقدار توصیه شده توسط شرکتهای تولید کننده است. بنابراین، برای جلوگیری از فشار انتخابی و در نتیجه رشد جدایه‌های مقاوم به بیوسید، بهتر است از دوز استاندارد ضد عفونی کننده مناسب، براساس MIC و نوع باکتری استفاده شود اما با وجود این نمی توان با قطعیت راجع به آن اظهار نظر کرد و نیاز به تحقیقات بیشتر در محیط های مختلف و شرایط متنوع می باشد. GMP اروپا و FDA آمریکا توصیه می کنند از ضد عفونی کننده‌ها به طور چرخشی استفاده شود تا از

مقاومت میکروبی جلوگیری به عمل بیاید (Guoyan، ۲۰۱۵). در این مطالعه، فراوانی جدایه های مقاوم، در ایزوله های محیطی بالاتر از ایزوله های بالینی بود. ممکن است دلیل این مشاهده این باشد که ایزوله های محیطی بیشتر از نمونه های بالینی در معرض بیوسیدها قرار دارند.

تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل پایان نامه دکترای حرفه ای دامپزشکی در سال ۱۴۰۱ می باشد. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از ریاست محترم دانشکده دامپزشکی سرکار خانم دکتر ورزندیان و پرسنل محترم آزمایشگاه بیطاران شیراز و اکتیو وت به دلیل همکاری در پیشبرد این مطالعه، ابراز می دارند.

تعارض منافع:

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

- Afsharivari**, S, Sial, R, Kayahan Ch, Ishil F. The effect of efflux pump inhibitors on the minimum inhibitory concentration of benzalkonium chloride and chlorhexidine in *Acinetobacter baumannii* isolates isolated from patients referred to Gazi Hospital, Ankara. *Urmia Medical Journal*.5(27).21-25. (In Persian)
- Dostundi**, S., Abiri R, Mohajeri P, Alwandi Ah. Phenotype and genotype of efflux pumps in isolates of *Acinetobacter* species isolated from patients hospitalized in Imam Reza and Taleghani hospitals of Kermanshah. 2012. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 126(25).1-11. (In Persian)
- Japoninejad A**, Sufian M, Ghaznavi Rad E. Molecular detection of ABC efflux pump genes in clinical strains of *Acinetobacter baumannii* and evaluation of its role in creating resistance to imipenem. *Journal of Southern Medicine*. 2013. Volume 17, Number 5, 408 to 415. (In Persian)
- Larry**. A., Mohammadi. E., Masjidyan. F., Mahmoudian. M. Investigating the synergistic effect of nospapine with ofloxacin in Enterobacteriaceae resistant to fluoroquinolones. *Scientific-Research Quarterly Journal of Iranian Medicinal and Aromatic Plants Research*. 1387; 24(1): 94-100. (In Persian)
- Adewoye L**, Sutherland A, Srikumar R, Poole K. The mexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity. *J Bacteriol* 2002; 184:4308-12.
- Ali et al**. Association between antibiotics and disinfectants resistance profiles among *Acinetobacter baumannii* isolates in Zagazig university hospitals intensive care unit. *Life Science Journal* 2014;11(10) (ISSN:1097-8135).
- Azadpour** et al, Presence of qacEΔ1 and cepA genes and susceptibility to a hospital biocide in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Iran, *Tropical Biomedicine*, 01 Mar 2015, 32(1):109-115, PMID: 25801259
- Bahador A**, Taheri M. *Medical Microbiology*. 2nd ed. Tehran: Ketabkhane farhang; 1389.
- Bialvaei AZ** et al. Epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in Iran: a systematic review and meta-analysis. *J Chemother*. 2017 Dec;29(6):327-337. Doi: 10.1080/1120009X.2017.1338377. Epub 2017 Jun 16.
- Biswas D**, Tiwari M, Tiwari V. Comparative mechanism-based study on disinfectants against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Cell Biochem*. 2018 Aug 26. Doi: 10.1002/jcb.27373.
- Blot S**. Limiting the attributable mortality of nosocomial infection and multidrug resistance in intensive care units. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(1): 5-13
- Bridier A**, Briandet R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants. *Biofouling*. 2011 Oct;27(9):1017-32. Doi: 10.1080/08927014.2011.626899. 79
- Brooks G.F**, Butel J.S. and Morse S.A. *Jawets Melnick and Adelberg's Medical Microbiology*, Lange Basic Science. 2004; pp:262-267.
- Brown VI**, Lowbury E.J.L. Use of an improved cefrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Pathology*. 1965;18(6):752-6.
- Chapman JS**. Biocide resistance mechanisms. *International Biodeterioration & Biodegradation* 51(2003) 133 – 138. Doi:10.1016/s0964-8305(02) 00097-5.
- Coyne S**, Courvalin P, Perichon B. Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Mar. 2011, p. 947-953. Doi:10.1128/AAC.01388-10.

- Daury L et al.** Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps. *Nat Commun.* 2016. **12**;7:10731. Doi: 10.1038/ncomms10731.
- De Lorenzo V,** Herrero M, Jakubzik U, Timmis KN. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *Journal of Bacteriology.* 1990 Nov 1; **172(11)**:6568-72.
- Dijun Du et al.** Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology,* volume 16, pages **523–539**(2018). DOI: 10.1038/s41579-018-0048-6.
- Lanjeri M,** Younes-Cauet G, Oertel-Buchheit P, Porte D, Schnarr M, Granger-Schnarr M. A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics MGG.* 2017 Jan 1; **257(2)**:205-12.
- Driscoll JA,** Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs.* 2007 Feb 1; **67(3)**:351-68.
- FAM Gomaa et al,** High Prevalence of bla_{NDM-1}, bla_{VIM}, qacE, and qacED1 Genes and Their Association with Decreased Susceptibility to Antibiotics and Common Hospital Biocides in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*, *Microorganisms,* **5(2)**,18, doi:10.3390/microorganisms5020018
- Fattahi.H,** *Diagnostic Veterinary Bacteriology.* first ed. Norbakhshpress, **1401**
- Fendrich C.** *Halovibrio variabilis* gen. nov. sp. nov., *Pseudomonas halophila* sp. nov. and a new halophilic aerobic coccoid Eubacterium from Great Salt Lake, Utah, USA. *Systematic and Applied Microbiology.* 1988; **11(1)**:36-43.
- Fernandez L,** Hancock REW. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 2012; **25(4)**: 661-81.
- Giamarellou H.** Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. *J Antimicrob Chemother.* **2002**; 49:229- 233.
- Gilbert P,** mcbain AJ. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2003; **16**:189–208. PMID: 12692093.
- Gorgani N,** Norozi, A Ahlbrand S, Patterson A, Pourmand N. Detection of point mutations associated with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of antimicrobial agents.* 1397; **34(5)**:414-8. (In Persian)
- Guerra-Santos LH,** Kappeli O, Fiechter A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 1986; **24(6)**:443-8.
- Guoyan Wu et al,** Evaluation of agar dilution and broth microdilution methods to determine the disinfectant susceptibility, *The Journal of Antibiotics* (2015) 68 , 661–665; doi:10.1038/ja.2015.51