Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 15(2023) 47-61

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,*Pseudomonasaeruginosa*,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 ضدعفونی کننده های داموسیب،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 ضدعفونی 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 ضدعفونی کننده های رایج در دامداری ها نطیر تیت میت، بهسادین و داموسیب بود.

در این پژوهش، ۱۰۰ نمونه از شیر از گاوهای مبتلا به ورم پستان در شهرهای شیراز و کازرون جمع آوری شدو پس از کشت بر روی محیط های مک کانکی و ستریمیدآگار از این تعداد؛ ۸ باکتری جدا شده از نمونه‌های 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 ضدعفونی کننده انجام شد.در بررسی اختلاف تغییرات MIC سه ضدعفونی کننده براساس آزمون Mann-Whitney U test بهسادین با ضدعفونی کننده های دیگر معنادار بود($P<0.05$)، به همین ترتیب اختلاف تغییرات MIC ضدعفونی کننده تیت میت با دو ضدعفونی کننده دیگر قویا معنادار بود($P<0.01$).نتایج به دست آمده از تحقیق نشان دادند غلظت‌های موثر بر مهاررشد سویه ها بسیار کمتر از میزان توصیه شده توسط شرکت‌های سازنده است. اعتقاد بر این است که استفاده زیاد از این مواد ضد میکروبی ممکن است باعث فشار انتخابی شده و به رشد گونه‌های مقاوم در برابر ضد عفونی کننده ها منجر شود.

واژه‌های کلیدی: ورم پستان، *سودوموناس ائروژنز*، داموسیب، 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

مقدمه

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 می‌باشد.(Afsharivari و همکاران، ۱۳۹۸. Dostundi و همکاران،۲۰۱۲.Fattahi و همکاران، ۱۴۰۰) سودوموناس ها باسیل های گرم منفی، هوازی و متحرک هستند و برخی از آنها رنگدانه های محلول در آب تولید می‌کنند. 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 ساکارید، 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 می‌شود.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 سیستیک فیبروزیس، عفونت چشم، گوش، عفونت زخم و ورم پستان می‌گردد(Azadpour و همکاران، ۲۰۱۵. Chapmanو همکاران، ۲۰۰۳.Brown و همکاران، ۱۹۶۵). در دام ها این باکتری از عوامل بیماری زای مقاوم به درمان می‌باشد که ضررهای اقتصادی بالایی را به صنعت دامپروری وارد می‌کند. *سودوموناس آئروژنز* به عنوان یکی از عوامل ایجادکننده ورم پستان های کلینیکی با شیوع ناگهانی در گاوهای شیری مطرح می‌باشد(Taheri و همکاران، ۱۳۸۹. Bialvaei و همکاران، ۲۰۱۷.Bolt و همکاران، ۲۰۰۸).

توسعه مقاومت آنتی بیوتیکی خصوصا مقاومت به آمینوگلیکوزیدهایی که با واسطه ی پلاسمید عمل می‌کنند سریعا باعث انتقال ژن مقاومت به سودوموناس های حساس و سایر باکتری های گرم منفی گردیده و ارگانیزم را نسبت به درمان مقاوم می‌کنند(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 مکانیسم های اصلی دفاعی در *سودوموناس آئروژنز* علیه آنتی بیوتیک ها و مواد ضد عفونی کننده می‌باشند(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 ازسلول می‌شود 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 می‌شود(Afsharivari و همکاران، ۱۳۹۸. Dostundi و همکاران،۲۰۱۲. Azadpourو همکاران، Tiwari.۲۰۱۵ و همکاران، ۲۰۱۸). پمپ های انتقال دهنده آنتی بیوتیک هایی از گروه های متفاوت می‌توانند با مقاومت دارویی چندگانه مرتبط باشند. پمپ‌های افلاکس چندگانه از لحاظ بالینی خطرناک محسوب می‌شوند زیرا کسب کردن و داشتن آنها موجب کاهش حساسیت ارگانیسم به طیف وسیعی از مواد می‌شود و در نتیجه انتخاب داروی موثر را با مشکل مواجه می‌نماید. (Brown و همکاران، ۱۹۶۵).

در حال حاضر ترکیبات ضدعفونی 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 ضدعفونی کننده ها در دامپزشکی مواد شیمیایی هستند.در سال های اخیر در برخی از کشورها ضدعفونی با استفاده از آئروسل ها بخصوص در مرغداری ها و دامداری های مدرن مورد مصرف گسترده ای پیدا کرده است، البته روش های فیزیکی ضدعفونی 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 کاملا تمیز و ضدعفونی شوند. در یک دامداری، ضدعفونی دستگاه شیردوشی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. هدف از شستشو و ضدعفونی دستگاه شیردوشی، از بین بردن میکروارگانیسم‌های باقیمانده موجود در داخل دستگاه بلافاصله قبل از شیردوشی است. نظافت یا ضدعفونی ناکافی یا نامناسب موجب می‌شود تا باکتری ها روی سطوح تجهیزات باقی بمانند، رشد کنند و تکثیر شوند . این منجر به افزایش تعداد باکتری ها در شیر می‌شود. در این مقاله به بررسی روش‌های گندزدایی و ضدعفونی دستگاه شیردوشی با تمرکز بر روی سه ماده پراستفاده در دامداری ها (تیت میت، بهسادین و داموسیب) پرداخته می‌شود.(Coyne و همکاران، ۲۰۱۱.Thomas و همکاران،۲۰۱۱. Chapmanو 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 گاوداری های منتخب، ۸۸ نمونه مربوط به بیماری های تحت بالینی (جدایه محیطی) و ۱۲جدایه 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$^{\circ}C$ ۳۷ گرماگذاری شدند. بعد از رشد باکتری پلیت های حاوی کلنی های مشکوک به سودوموناس جدا و تست های 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 دمای۴۲ درجه سانتی گراد 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 لوپ به ویال های حاوی محیط نوترینت براث دارای ۱۲٪ گلیسرول منتقل کرده و پس از ورتکس در دمای ۲۰- نگهداری می‌کنیم.(Fattahi و همکاران، ۱۴۰۰، Daury و همکاران، ۲۰۱۶. De Lorenzo و همکاران، ۱۹۹۰)

در پژوهش حاضر سه ضدعفونی کننده شیمیایی رایج موجود در بازار که در ضدعفونی 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 جدایه ها با ضد عفونی کننده‌های مذکور، رقیق سازی با آب مقطر با مقادیر مختلف صورت گرفت تا میزان اثر بخشی هر یک از رقت های تهیه شده بر سویه ها با معیار MIC سنجیده شود.

برای تعیین میزان MIC ضدعفونی کننده‌های۳ 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 رقت های سریالی ۳ ضدعفونی کننده، مورد استفاده قرار گرفت ۸. چاهک ردیف اول برای هر جدایه به ضدعفونی کننده داموسیب، ردیف دوم به ضدعفونی کننده تیت میت و ردیف سوم به ضدعفونی کننده بهسادین‌تعلق 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 هینتون براث حاوی جدایه استاندارد *سودوموناس ائروژنز* ATCC 85327 اما عاری از ضدعفونی‌کننده تزریق شد. محتوای چاهک کنترل منفی محیط مولرهینتون براث استریل و بدون باکتری بود. رقت‌های(غلظت ها) 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٪، ۶.۵٪، ۳.۲۵٪،

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. میکروپلیت ها پس از تزریق سوسپانسیون میکروبی و ضد عفونی کننده ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت، میکروپلیت ها مورد بازبینی قرار گرفتند و میزان MIC برای هریک از ضدعفونی کننده ها تعیین شد.برای تعیین میزان حداقل کشندگی باکتری یا MBC پس از بررسی میکروپلیت ۹۶ خانه و تعیین چاهک هایMIC ، از این چاهک ها و خانه های شفاف در هر ردیف، ۳۰ میکرولیتر برداشت شده و به پلیت های ۶ سانتی متری حاوی محیط کشت مولارهینتون آگار(شرکت مرک آلمان) منتقل و با استفاده از پیپت پاستور شیشه ای بر روی محیط پخش شد. سپس پلیت ها برای ۱۸-۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفتند. پلیت ها پس از این مدت مورد بررسی قرار گرفتند تا غلظت MBC برای ضدعفونی کننده ها 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 ۰/۰۵ 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 داموسیب(D) نتایج بر عکس است به این مفهوم که غلظت های زیاد داموسیب 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(جدول۳-۱). غلظت مورداستفاده برای هریک از ضدعفونی کننده ها بر اساس سفارش شرکت سازنده به ترتیب ۲٪ برای داموسیب، 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

ضدعفونی کننده	غلظت‌مصرفی رایج*	غلظت‌های سریالی(%)هر یک از ضد عفونی کننده ها برای تعیین MIC								
		-	-	۳	۴	۵	۶	۷	۸
-	-	-	-	۰.۶۲	۰.۳۱	۰.۱۵	۰.۰۷	۰.۰۳	۰.۰۱
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) ،بهسادین(B)، داموسیب(D)

جدول ۳-۲- MIC و MBC هریک از ضد عفونی کننده ها در ایزوله های *سودوموناس ائروژنز*

غلظت(٪) ضد عفونی کننده ها	حداقل MIC	حداکثر MIC	فراوانترین MIC (درصد فراوانی)	محدوده غلظت	حداقل MBC	حداکثر MBC	فراوانترین MBC(درصد فراوانی)
داموسیب	۰.۰۷۸	۰.۱۵	۰.۰۷۸ (۸۲.۷)	۲.۵–۰.۱۹	۰.۰۷۸	۰.۱۵	۰.۰۷۸ (۸۲.۷)
تیت میت	۰.۱۵	۰.۶	۰.۳ (۴۸.۲)	۵–۰.۳۹	۰.۱۵	۱.۲۵	۰.۳ (۳۸)
بهسادین	۳.۱۲	۲۵	۱۲.۵ (۵۸.۶)	۱۰۰–۰.۷۸	۳.۱۲	۲۵	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 ضدعفونی 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 می‌گردد، در ضدعفونی کننده داموسیب بیش از ۸۲٪ نمونه ها دارای MIC و MBC معادل ۰.۰۸۷٪ بودند که درصد نسبتاً قابل توجهی است. همچنین در ضد عفونی کننده بهسادین حدود ۶۰٪ از سویه ها دارای MIC و MBC معادل ۱۲.۵٪ بودند. از سوی دیگر همسانی غلظت MIC و MBC در هر سه ضدعفونی کننده نشان دهنده خاصیت باکتریسیدال ضدعفونی کننده ها در ایزوله ها *سودوموناس ائروژنز*است 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 ضدعفونی کننده های سه گانه (بر حسب درصد)

ضد عفونی کننده ها	داموسیب		تیت میت		بهسادین	
سویه ها	MIC (٪)	MBC (٪)	MIC (٪)	MBC (٪)	MIC (٪)	MBC (٪)
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 مشخص‌های شده و
غلظت مواد ضد عفونی کننده در MIC50 وMIC 90
تیت میت(TM) ،بهسادین(B)، داموسیب(D)

MIC90	MIC50	تعداد سویه ها در MICهای مشخص شده								غلظت مصرفی رایج	ضد عفونی کننده ها
		۰.۰۱	۰.۰۳	۰.۰۷	۰.۱۵	۰.۳۱	۰.۶۲	۰.۱۲۵	۲.۵		
۰.۱۵	۰.۰۷	۰	۰	۴	۴	۰	۰	۰	۰	۲٪	D
MIC90	MIC50	تعداد سویه ها در MICهای مشخص شده									
		۰.۰۳	۰.۰۷	۰.۱۵	۰.۳۱	۰.۶۲	۱.۲۵	۲.۵	۵	۱۰۰٪ (بدون‌رقیق‌سازی)	TM
۰.۶۲	۰.۳۱	۰	۰	۳	۴	۱	۰	۰	۰		
MIC90	MIC50	تعداد سویه ها در MICهای مشخص شده									
		۰.۷۸	۱.۵۶	۳.۱۲	۶.۲۵	۱۲.۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۱۰۰٪ (بدون رقیق سازی)	B
۲۵	۱۲.۵	۰	۰	۱	۰	۵	۲	۰	۰		

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 ضدعفونی 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 ضدعفونی کننده، تعیین شد با این توضیح که جدایه هایی که حداقل نسبت به یک ضدعفونی کننده مقاوم بودند به طور کلی مقاوم در نظر گرفته شدند. یک جدایه(۱۲/۵٪) از مجموع جدایه ها به دو ضدعفونی 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)

جدول۳-۵-میزان MIC و محدوده حساسیت ایزوله‌های *سودوموناس ائروژنز*در سه ضد عفونی کننده سویه‌های مشخص شده با رنگ متفاوت محیطی هستند.

	تیت میت		بهسادین		داموسیب		ضد عفونی کننده‌ها
برآیند کلی حساسیت	حساس/ مقاوم	MIC (٪)	حساس/ مقاوم	MIC (٪)	حساس/ مقاوم	MIC(٪)	جدایه ها
حساس	حساس	۱۲.۵	حساس	۰.۱۵	حساس	۰.۰۷۸	۱
حساس	حساس	۱۲.۵	حساس	۰.۳	حساس	۰.۰۷۸	۲
حساس	حساس	۱۲.۵	حساس	۰.۱۵	حساس	۰.۰۷۸	۳
حساس	حساس	۱۲.۵	حساس	۰.۳	حساس	۰.۰۷۸	۴
حساس	حساس	۱۲.۵	حساس	۰.۱۵	حساس	۰.۰۷۸	۵
مقاوم	مقاوم	۲۵	حساس	۰.۱۵	حساس	۰.۰۷۸	۶
مقاوم	مقاوم	۲۵	حساس	۰.۳	مقاوم	۰.۱۵	۷
مقاوم	مقاوم	۲۵	حساس	۰۶	حساس	۰.۰۷۸	۸

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

چنانکه ملاحظه می گردد بیشترین درصد حساسیت جدایه ها نسبت به ضدعفونی کننده بهسادین ایجاد شده است و دو ضدعفونی کننده داموسیب و تیت میت به ترتیب در رتبه دوم و سوم قرار دارند. بر همین مبنا، بیشترین درصد مقاومت جدایه ها نسبت به ضدعفونی کننده تیت میت ایجاد شده است و دو ضدعفونی کننده داموسیب و بهسادین به ترتیب در رده دوم و سوم قرار دارند. با وجود بیشتر بودن درصد حساسیت در مقایسه با درصد مقاومت در هریک از ضدعفونی کننده ها به تنهایی، اما بر مبنای معیار تعیین حساسیت کل، درصد جدایه های حساس در مجموع کمتر از درصد جدایه های مقاوم است.

میانگین تغییرات MIC و MBC سه ضدعفونی کننده مورد بررسی در هریک از ۸ نمونه *سودوموناس ائروژنز* مورد تحلیل قرار گرفت. میانگین MIC ضدعفونی کننده داموسیب در جدایه های مورد مطالعه۱۶/۶۲، تیت میت ۰/۱۹ و بهسادین ۰/۲۸ محاسبه شد.

ارتباط بین تغییرات MIC سه ضدعفونی کننده در ایزوله های *سودوموناس ائروژنز* با آزمون همبستگی پیرسون مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که ارتباط بین MIC ضدعفونی کننده‌های D و TM، با(r=-0.159) و(P=0.420)، ارتباط بین MIC ضد عفونی کننده‌های D و B، با(r=-0.108) و(P=0.585) و ارتباط بین MIC ضد عفونی کننده‌های TM و B، با(r=-0.8) و(P=0.687)، ضعیف و در جهت عکس یکدیگر است.

همچنین اختلاف بین تغییرات MIC سه ضدعفونی کننده در ایزوله های *سودوموناس ائروژنز* با آزمون Mann

Whitney U Test مورد بررسی قرار گرفت؛ بر این اساس بین MIC ضدعفونی کننده داموسیب و سایر ضدعفونی کننده ها اختلاف معنی داری مشاهده نشد.(P=0.47) بین میانگین MIC ضدعفونی کننده تیت میت نسبت به سایر ضدعفونی کننده ها اختلاف معنی دار بود. [(P= 0.019) p<0.05] بین میانگین MIC ضدعفونی کننده بهسادین نسبت به سایر ضدعفونی کننده ها اختلاف معنی دار بود [(P= 0.006) p<0.01].

از سوی دیگر ارتباط بین تغییرات MBC سه ضدعفونی کننده در ایزوله های *سودوموناس ائروژنز* با آزمون همبستگی پیرسون مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که ارتباط بین MBC ضدعفونی کننده های Dو TM با(r=-0.261) و(P=0.18)، ضعیف و عکس یکدیگر، ارتباط بین MBC ضدعفونی کننده هایD و B، با(r= 0.332) و(P= 0.085)، متوسط و مثبت، و ارتباط بین MBC ضدعفونی کننده های 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 ائروژنز*، بر اساس آزمون Chi-Square اختلاف معنی داری وجود نداشت(P=0.611)

بحث

دراین مطالعه که براساس چگونگی واکنش *سودوموناس ائروژنز*به برخی از ضد عفونی کننده های پستانی موجود در بازار ایران انجام گردید به بررسی اثر سه ضد عفونی کننده داموسیب، تیت میت و بهسادین بر نوع واکنش حساسیت میکروبی(که با فاکتور MIC نشان داده می شود) پرداخته شد. غلظت سه ماده ضدعفونی 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 ضدعفونی کننده‌های تیت میت و بهسادین که محلول های آماده مصرف اند و نیازی به رقیق‌سازی ندارند در غلظت‌های کمتر از غلظت توصیه‌شده نیز منجر به مهار رشد یا مرگ باکتری‌ها می شدند.(Gomaa و همکاران، ۲۰۱۸. Fendrich و همکاران، ۱۹۸۸. Hancock و همکاران، ۱۳۹۸.Giamarellou، ۲۰۰۲)

حداکثر غلظت مؤثر بر مهار رشد در ضد عفونی کننده بهسادین غلظت ۲۵٪(غلظت توصیه شده= ۱۰۰٪) و در تیت میت ۰.۶٪(غلظت توصیه شده= ۱۰۰٪) بود. همین مورد در مورد MBCنیز 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.)

اسداللهی‌و 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 دو ضدعفونی کننده بیمارستانی نانوسیل و اوپا، و شش برابر، در ماده ضد عفونی کننده ای دی مکس، پایین تر از غلظت توصیه شده بود.(اسداللهی‌و همکاران، ۲۰۱۸)

بیسواس و همکاران(۲۰۱۸)تاکید می‌کنند که غلظت کمتر مواد ضد عفونی کننده منجر به کنترل جدایه های مقاوم می شود. همچنین غلظت بالای بیوسید برای انسان و محیط زیست سمی است و هزینه پاکسازی مراکز درمانی را هم افزایش می دهد.(بیسواس و همکاران، ۲۰۱۸)

لانجری و همکاران(۲۰۱۷) نیز بر لزوم استفاده از ضد عفونی کننده ها در رقت توصیه شده توسط سازنده تأکید می کنند. (لانجری و همکاران، ۲۰۱۷)

استفاده از غلظت‌های بالاتر از سطح مؤثر می‌تواند به دلیل‌قطع رشد جدایه‌های حساس و ایجاد فشار انتخابی‌منجر به گسترش جدایه‌های مقاوم‌تر و بروز مشکلات‌جدید در کنترل عفونت شود. (بیسواس و همکاران، ۲۰۱۸. اسداللهی‌و همکاران، ۲۰۱۸. لانجری و همکاران، ۲۰۱۷))

در مطالعه نوروزی و همکاران، تمام ایزوله های *سودوموناس ائروژنز* در برابر غلظت های توصیه شده ضدعفونی کننده های نانوسیل و اپا مقاوم بودند.(نوروزی 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. اسداللهی‌و 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 عفونت‌دهنده است، نه برای مهار گونه خاصی از عوامل عفونت زا مانند *سودوموناس ائروژنز* در ضد عفونی کننده داموسیب، 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٪رشد نشان‌دادند.این امکان وجود دارد که ضد عفونی کننده های بیمارستانی مطابق با استانداردهای اروپایی تهیه شده و با ماهیت و شکل توزیع عوامل عفونی‌در ایران مطابقت نداشته باشند. در تحقیق حاضر، MICو MB به دست آمده در دو ضد عفونی کننده داموسیب 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. اسداللهی‌و همکاران، ۲۰۱۸. لانجری و همکاران، ۲۰۱۷)

در این مطالعه، حساسیت و مقاومت جدایه ها بر مبنای تعیین MIC50و MIC90 محاسبه شد. بر این اساس، جدایه های با غلظت MIC منطبق بر MIC50 و کمتر از آن به عنوان جدایه های حساس به ضدعفونی 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 داموسیب، ۶۲/۵٪ به تیت میت و ۱۰۰٪ به بهسادین حساس بودند و ۱۲/۵٪ از جدایه ها به داموسیب، 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 MBCمی‌تواند 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 ضدعفونی در ایزوله های *سودوموناس ائروژنز*با آزمون همبستگی پیرسون مورد مقایسه قرار گرفت و نتایج نشان داد که ارتباط بین MIC سه ضدعفونی کننده معنی دار نیست. همچنین در بررسی MBC سه

ضدعفونی‌کننده نیز مشخص گردید که ارتباط بین MBC ضدعفونی کننده های داموسیب و بهسادین(R=0.332) و(P=0.085) مثبت و متوسط بود. همچنین اختلاف میانگین MIC سه ضدعفونی کننده بر اساس آزمون من ویتنی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که اختلاف تغییرات MIC داموسیب نسبت به دو ضدعفونی کننده دیگر معنی دار نیست(P=0.47) اما اختلاف تغییرات MICتیت میت و سایر مواد ضد عفونی کننده معنی دار است.(P<0.05) به همین ترتیب، اختلاف معنی داری بین تغییرات MIC ضدعفونی 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 ضدعفونی 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*براساس آزمون کای اسکوئر اختلاف معنی داری وجود نداشت(P= 0.611).

از ۸ جدایه مورد مطالعه در سه سری ۸ تکراره برای سه ماده ضدعفونی کننده؛ ۲۰ جدایه(۸۳/۳٪) حساس و ۴ جدایه(۱۶/۷٪) مقاوم بودند. از بین جدایه‌های 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. براساس 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 ضدعفونی 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 ضدعفونی کننده(Gomaa و همکاران، ۲۰۱۸. Tiwari و همکاران، ۲۰۱۸) و شکل حضور ایزوله در محیط(بیوفیلم یا پلانکتون)(Azadpour و همکاران، ۲۰۱۵. Fattahiو همکاران، ۱۴۰۰) بستگی دارد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه گرچه نشان‌داد که غلظت‌های مؤثر ضدعفونی کننده های مورد بررسی در مهار رشد جدایه های *سودوموناس ائروژنز*کمتر 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 باوجود 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 می‌کنند 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.

منابع

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 noscapine 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 Midrobiology.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 EJL. Use of an improved cetrimide 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 multidru 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 andanalyzing protein heterodimerization in Escherichia coli. Molecular and General Genetics MGG. 2017Jan 1; **257(2)**:205-12.

Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. Theepidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. Drugs.2007 Feb 1;**67(3)**:351-68.

FAM Gomaa et al, High Prevalence of blaNDM-1, blaVIM, 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 serve 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 continous 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