Archive of SID

پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال شانزدهم، شماره ۲، پی در پی ۸۰، صفحات ۸۳ تا ۹۱
خرداد و تیر ۱۳۹۰

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۵/۲۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۱/۳۰

بررسی وجود ژن‌های مقاومت بیوسایدی qac A/B و smr در استافیلوکوکوس اورئوس‌های به دست آمده از منابع کلینیکی و غیر کلینیکی

دکتر جمیله نوروزی[۱]، دکتر پرویز پاکزاد[۱]، المیرا ابراهیمی[۲*]، رویا رضوی‌پور[۳]

۱. استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
۳. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، آزمایشگاه محمودیه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

چکیده

سابقه و هدف: مصرف گسترده مواد بیوسایدی حاوی ترکیبات چهارتایی آمونیوم (QACs) منجر به پیدایش سویه‌های استافیلوکوکسی مقاوم به این مواد شده است. هدف از این مطالعه، بررسی حضور ژن‌های مقاومت به مواد بیوسایدی همچون qac A/B و smr و ارتباط آنها با حضور ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان استافیلوکوکوس اورئوس‌های جداسازی شده از منابع مختلف بود.

مواد و روشها: ۴۲ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس از منابع کلینیکی، ۱۱ نمونه از مواد لبنی غیر پاستوریزه و ۳۲ نمونه از سواب‌های گرفته شده از بینی افراد سالم، از مجموع ۱۵۰ نمونه جمع آوری شده، ایزوله گردید. حساسیت به ماده بیوسایدی حاوی دی‌دسیل دی‌متیل آمونیوم کلرید به روش Colorimetric Broth Microdilution سنجیده شد. PCR برای یافتن ژن‌های qac A/B، smr، bla Z و mec A انجام گرفت.

یافته‌ها: ۵۰٪ از نمونه‌های کلینیکی، ۳۶/۳۶٪ از نمونه‌های لبنی و ۱۵/۶٪ از نمونه‌های بینی با محدوده MIC بین ۱/۹۵-۷/۸۱ µg/ml به ماده بیوسایدی مقاوم بودند. فراوانی ژن‌های qac A/B و smr در ۴۲ نمونه کلینیکی به ترتیب ۱۹/۰۴٪ و ۴۵/۲٪ بود که بیشتر از فراوانی آنها (به ترتیب ۲/۳٪ و ۲۰/۹٪) در سایر نمونه‌ها بود ($p<0/05$). ژن غالب در میان نمونه‌های به‌دست آمده از بینی، smr با فراوانی ۱۵/۶٪ بود. ارتباط معنی‌داری بین حضور همزمان حداقل یکی از ژن‌های مقاومت به ماده بیوسایدی با ژن bla Z در نمونه‌های کلینیکی ($p<0/04$) و نمونه‌های به‌دست آمده از لبنیات غیر پاستوریزه ($p<0/024$) مشاهده گردید و این در حالی بود که ارتباط معنی‌داری بین حضور ژن‌های بیوسایدی با ژن mec A بدست نیامد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش برای اولین بار در ایران، نه تنها حضور گسترده ژن‌های qac A/B و smr را در استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار داده است، بلکه حضور ژن smr را (با فراوانی ۱۵/۶٪) در حاملین بینی استافیلوکوکوس اورئوس گزارش می‌نماید. مطالعه حاضر با تأیید مطالعات قبلی، بر وجود ارتباط نزدیک بین مقاومت به QACs و مقاومت به پنی سیلین‌ها تاکید دارد. حضور ژن‌های qac در جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس و توانایی آنها در توسعه مقاومت بیولوژیک و بروز مقاومت همزمان با آنتی بیوتیک‌ها، اهمیت استراتژی‌های کنترل عفونت مؤثر را آشکار می‌نماید.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، ترکیبات چهارتایی آمونیوم، ژن qac A/B ، ژن smr

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Nowroozi J, Pakzad P, Ebrahimi E, Razavipour R. Detection of biocide resistance genes, qac A/B and smr, among isolated Staphylococcus aureus from clinical and non-clinical sources. Pejouhandeh 2011;16(2):83-91.

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس از جمله استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)،که از ویژگیهای آن مقاومت به چندین آنتی بیوتیک است، یکی از مهمترین پاتوژن‌هایی است که در ایجاد عفونتهای اکتسابی از بیمارستان مطرح می‌باشد.

این عفونتها شامل آبسه در بافت نرم، اندوکاردیت و باکتریمی می‌باشند (۱ و ۲). حضور سویه‌های استافیلوکوک مقاوم به مواد ضد میکروبی در مراکز بیمارستانی و همچنین در جامعه، دانشمندان را وادار ساخته است تا مواد دارویی را جهت درمان عفونتهایی که عامل آنها استافیلوکوکسی‌های مقاوم هستند، توسعه دهند (۲). در سالهای اخیر، تلاشهای قابل توجهی در جهت ارتقا کنترل عفونت مؤثر در بیمارستانها انجام شده که

*نویسنده مسؤول مکاتبات: المیرا ابراهیمی؛ دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شمال؛ پست الکترونیک: ellvlira@hotmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

منجر به افزایش مصرف دزانفکتانت‌ها و آنتی سپتیک‌ها گشته است (۳). ضدعفونی کننده‌ها با پایه ترکیبات چهارتایی آمونیوم (QACs) مثل بنزالکونیوم کلراید، ستیل پریدینیوم کلراید، ستریماید، پروسئین و دتیزور به طور فراوانی در بیمارستانها جهت ضد عفونی کردن سطوح و جلوگیری از گسترش عفونت مصرف می‌شوند. تصور بر آن است که گسترش وسیع در مصرف QACs ممکن است موجب فشار انتخابی شده و در پیدایش میکروارگانیزم‌های مقاوم به این مواد در محیطهای کلینیکی دخیل باشد (۴). حداقل ۱۲ ژن ایجاد کننده مقاومت به مواد آنتی سپتیکی (qac A-J، smr و nor A) در استافیلوکوکسی‌ها شناسایی شده است (۱، ۵ و ۶). ژن‌های qac A، qac B، smr و nor A به طور معمول در سویه‌های کلینیکی استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شده‌اند که کد کننده پمپ‌های دفعی وابسته به نیروی محرکه پروتونی هستند. ژن‌های qac A، qac B و smr معمولاً بر روی پلاسمیدها یافت شده‌اند (۴ و ۱۰-۷). دیگر ژن‌های qac همچون qac G، qac H و qac J در استافیلوکوک‌های بدست آمده از دام و مواد غذایی و لبنی مشاهده شده‌اند (۳ و ۷).

از سوی دیگر، مصرف وسیع آنتی‌بیوتیک‌ها توسط انسان و حیوانات منجر به توسعه و گسترش تعداد زیادی شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان جمعیت باکتریایی شده است که منجر به مشکلات جدی در زمینه سلامت عمومی گشته است. این در حالیست که وجود پتانسیل در پیدایش مقاومت متقاطع و همزمان بین ضدعفونی کننده‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها که به طور وسیعی در حال مصرف هستند خودنمایی می‌کند (۴ و ۱۱). بعضی از مکانیزم‌های مقاومت (همچون سیستم‌های پمپ دفعی، تغییر در نفوذپذیری و تشکیل بیوفیلم) برای آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد بیوسایدی مشترک است. شواهد علمی به‌دست آمده از اطلاعات باکتریولوژی، بیوشیمیایی و ژنتیکی تأکید دارند که استفاده از مولکول‌های فعال در محصولات بیوسایدی ممکن است در افزایش بروز باکتری‌های مقاوم به مواد آنتی‌بیوتیکی دخیل باشند. فشار استرسی انتخابی که توسط بیوسایدها ایجاد می‌شود ممکن است به گزینش باکتری‌هایی منجر شود که مکانیزم‌های مقاومت و یا دفع این مواد را بیان می‌دارند (۱۲ و ۱۳).

وجود ژن‌های مقاومت بر روی عناصر ژنتیکی متحرک همچون پلاسمیدها (pST6، pSK4 و pSK41) و ترانسپوزون‌ها (Tn552 و Tn4002) ممکن است به گسترش اپیدمیک مقاومت مابین گونه‌ها منجر گردد. شاخصهای مقاومت qac همراه با ژن‌های کدکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامیسین، تری متوپریم، پنی سیلین،کانامایسین و توبرامایسین بر روی عناصر ژنتیکی متحرک یافت شده‌اند (۴). گزارشهای بسیاری مبنی بر حضور ژن qac A/B و ژن بتالاکتاماز (bla Z) بر روی پلاسمیدهای مشترک وجود دارد. در نتیجه قابل تصور است که مصرف QACs بتواند در گزینش استافیلوکوکسی‌های مقاوم به پنی سیلین دخیل باشد (۱، ۴ و ۷).

این مطالعه با هدف سنجش حساسیت سویه‌های باکتریایی نسبت به ماده بیوسایدی حاوی QACs، بررسی حضور ژن‌های qac A/B و smr در استافیلوکوکوس اورئوس و ارتباط آنها با حضور ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی همچون bla Z و mec A انجام گرفت.

مواد و روشها

۱۵۰ نمونه (کلینیکی و غیر کلینیکی) به طور تصادفی طی ماههای بهمن و اسفند سال ۱۳۸۸ از منابع مختلف جمع‌آوری شدند. ۵۴ نمونه کلینیکی مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس، از بیماران مبتلا به سوختگی بیمارستان سوانح سوختگی مطهری و بیماران بستری در بیمارستان شهدای تجریش و مجتمع درمانی حضرت رسول اکرم تهیه شده و جهت بررسی حضور استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه قرار گرفتند. ۲۵ محصول لبنی غیر پاستوریزه نیز از چندین نقطه از شهر تهران جمع‌آوری شده و آزمایشهای تأییدی جهت حضور استافیلوکوکوس اورئوس بر روی آنها صورت گرفت. دسته آخر نیز ۷۱ فرد سالم، بدون سابقه بستری در بیمارستان در طی یک ماه گذشته و مصرف اخیر آنتی‌بیوتیک بودند که جهت بررسی حضور استافیلوکوکوس اورئوس در بینی، مورد مطالعه قرار گرفتند. حضور استافیلوکوکوس اورئوس به دنبال انجام رنگ آمیزی گرم، کشت بر روی محیطهای مانیتول سالت آگار، بلاد آگار، تست DNase و مشاهده تولید کواگولاز و مثبت بودن تست کاتالاز مورد تأیید قرار گرفت. سویه‌های به‌دست آمده از سواب‌های گرفته شده از مواد غذایی و لبنی، ابتدا بر روی محیط برد پارکر (Baird parker) برده شدند و بدنبال آن، سایر مراحل شناسایی به شرح فوق صورت گرفت. سویه‌های کنترل استاندارد ATCC 25923 و PTCC 1112 جهت کنترل کیفیت آزمایشهای سنجش حساسیت بکار برده شدند. ماده بیوسایدی Surfanios Citron (ANIOS) حاوی didecyldimethyl ammonium chloride (DDAC) از شرکت آیریا برنا (Ayriaborna) خریداری شد.

۲، ۳، ۵- تری فنیل تترازولیوم کلراید (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, TTC) پودر زرد رنگی است

www.SID.ir

Archive of SID

که توسط دهیدروژناز موجود در سلول‌های زنده به ماده نامحلول فرمازان (formazan) احیا می‌شود و در این مطالعه به عنوان معرف درسنجش حساسیت به ماده ضد میکروبی به کار گرفته شد (۱۴).

سنجش حساسیت به ماده بیوسایدی به روش broth microdilution و مطابق با اصول CLSI در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام گرفت (۱۵). تنها استثنا در این رابطه، TTC بود که به محیط مولر هینتون براث با غلظت ۰/۶۲۵ mg/ml اضافه گردید (۱۸-۱۶). سوسپانسیون میکروبی مشابه کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند ($1/5\times10^8$ cfu/ml) تهیه گردید و به غلظت نهایی 5×10^5 cfu/ml در هر چاهک رسانده شد. میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ ºC-۳۵ به مدت ۲۴-۱۸ ساعت نگهداری شدند. تشکیل رسوب صورتی مایل به قرمز بعد از گذشت مدت زمان لازم نشان از رشد باکتری دارد. آخرین چاهکی که در آن عدم رشد مشاهده گردید به عنوان حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) گزارش شد. بدنبال تعیین MIC، حداقل غلظت کشندگی (MBC) هر یک از سویه‌های باکتریایی با انتقال ۱۰۰ µL از هر چاهک به محیط کشت مولر هینتون آگار و نگهداری به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷-۳۵ ºC تعیین گردید.

جهت استخراج ژنوم باکتریایی استافیلوکوکوس اورئوس‌های جداسازی شده، از کیت MBST DNA extraction استفاده گردید. جستجو برای یافتن ژن‌های qac A/B، smr، bla Z و mec A مطابق توالی پرایمرهای ذکر شده در جدول ۱ صورت گرفت.

جدول ۱- توالی پرایمر ژن‌های qac A/B، smr، bla Z و mec A

نام پرایمر	توالی پرایمر	منبع
qacA/B F	CCACTACAGATTCTTCAGCTACATG	(۱۹)
qacA/B R	CTATGGCAATAGGAGATATGGTGT	(۱۹)
mecA F	GTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGC	Gene bank accession no.(X52593)
mecA R	GTCAACGATTGTGACACGATAGC	Gene bank accession no.(X52593)
smr F	GCCATAAGTACTGAAGTTATTGGA	(۲۰)
smr R	GACTACGGTTGTTAAGACTAAACCT	(۲۰)
blaZ F	TACAACTGTAATATCGGAGGG	Gene bank accession no.(X52734)
blaZ R	AGGAGAATAAGCAACTATATCATC	Gene bank accession no.(X52734)

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ µL انجام شد. در این واکنش، ۲/۵ µL بافر PCR (×10)، ۱ µL از مخلوط دزاکسی نوکلئوتید تری فسفات، ۰/۵ µL از نمک $MgCl_2$، ۱ µL از هر پرایمر F و R، ۰/۵ µL آنزیم Taq DNA Polymerase و ۸ µL از DNA الگو با یکدیگر مخلوط و حجم نهایی توسط آب دوبار تقطیر به ۲۵ µL رسانده شد. واکنش در ۳۰ سیکل مطابق جدول ۲ انجام گرفت.

محصولات PCR به دنبال الکتروفورز بر روی ژل آگار ۱٪ و قرارگیری در اتیدیوم برماید، با استفاده از نور UV مورد بررسی قرار گرفتند. اطلاعات بدست آمده توسط نرم افزار SPSS (Version 17) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته شد و بر حسب مورد از آزمونهای کای‌دو، آزمون دقیق فیشر و Kruskal-wallis استفاده گردید. $p<0/05$ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

از مجموع ۱۵۰ نمونه جمع آوری شده، ۸۵ مورد استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله و شناسایی گردید. از ۵۴ نمونه کلینیکی تهیه شده از بیماران مبتلا به سوختگی و بستری در بیمارستان، ۴۲ سویه بدنبال انجام تست‌های تشخیصی به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس تأیید شدند. از بین ۲۵ نمونه گرفته شده از لبنیات غیر پاستوریزه، ۱۱ استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله گردید. از مجموع ۷۱ فرد مورد مطالعه در این بررسی نیز، ۳۲ نفر (۴۵٪) به عنوان حامل استافیلوکوکوس اورئوس در بینی خود معرفی شدند.

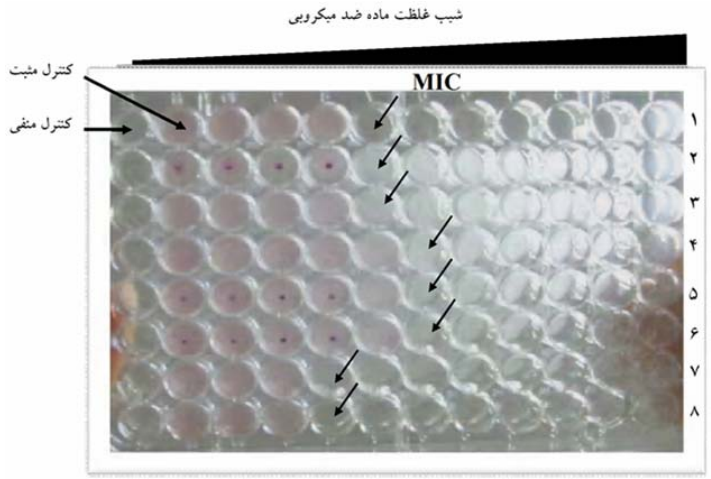
جدول ۲- مراحل واکنش PCR

مراحل		حرارت (ºC)	زمان (ثانیه)
Denaturation	qac A/B	۹۶	۱۸۰
		۹۵	۴۵
	smr	۹۶	۱۸۰
		۹۵	۴۵
	mec A	۹۵	۳۰۰
		۹۵	۴۵
	bla Z	۹۶	۱۸۰
		۹۵	۴۵
Annealing	qac A/B	۶۴	۶۰
	smr	۶۱	۶۰
	mec A	۶۷	۴۵
	bla Z	۵۵	۶۰
Extention	qac A/B	۷۲	۹۰
	smr	۷۲	۹۰
	mec A	۷۲	۴۵
	bla Z	۷۲	۹۰
Final extention	qac A/B	۷۲	۴۲۰
	smr	۷۲	۴۲۰
	mec A	۷۲	۳۰۰
	bla Z	۷۲	۴۲۰

www.SID.ir

Archive of SID

ماده بیوسایدی حاوی DDAC طبق دستورالعمل تولید کننده در غلظت ۰/۲۵٪ (w/v) تهیه شد. در این مطالعه حساسیت ۸۵ استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به ماده بیوسایدی سورفانیوس سیترون (Surfanios Citron) سنجیده شد (شکل ۱).

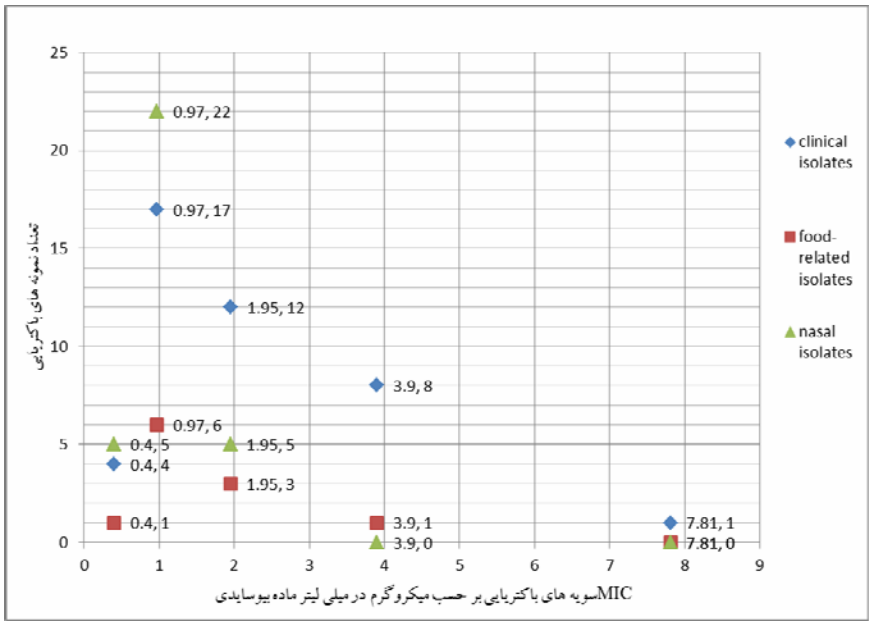


شکل ۱- سنجش حساسیت به ماده بیوسایدی حاوی QACs به روش براث میکرودیلوشن- تصویر از زیر میکروپلیت

کمینه محدوده MIC سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه در این بررسی، ۰/۴ µg/ml و بیشینه آن ۷/۸۱ µg/ml بود. از آنجایی که تعریف واحدی برای "حد مقاومت" به ماده بیوسایدی حاوی QACs وجود ندارد (۲۱)، سویه‌هایی از استافیلوکوکوس اورئوس که دارای MIC بالاتری نسبت به سویه‌های کنترل استاندارد بودند (≥۱/۹۵ µg/ml) به عنوان سویه‌های مقاوم به DDAC قلمداد شدند. از مقایسه میانگین MIC سویه‌های متعلق به گروههای کلینیکی، نمونه‌های بدست آمده از لبنیات غیر پاستوریزه و نمونه‌های جدا شده از بینی، نتایج معنی‌داری حاصل گردید (p<۰/۰۵). نمودار ۱، نتایج سنجش حساسیت سویه‌های باکتریایی نسبت به ماده بیوسایدی را نشان می‌دهد.

بررسی نتایج MBC ۸۵ نمونه فوق حاکی از آن بود که تمام نمونه‌ها دارای MBC کمتر از ۰/۰۱٪ (w/v) بودند. به‌طوری‌که ۷ نمونه (۸/۲۳٪) دارای MBC ۰/۰۰۷۸٪ (w/v) و ۷۸ نمونه (۹۱/۷۶٪) دارای MBC ۰/۰۰۳۹٪ (w/v) بودند. فراوانی ژن‌های qac A/B، smr، bla Z و mec A در ۸۵ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه به ترتیب (۹) ۱۰/۵٪، (۲۸) ۳۲/۹٪، (۴۴) ۵۱/۷٪ و (۱۸) ۲۱/۱٪ بود (شکل ۲).

.

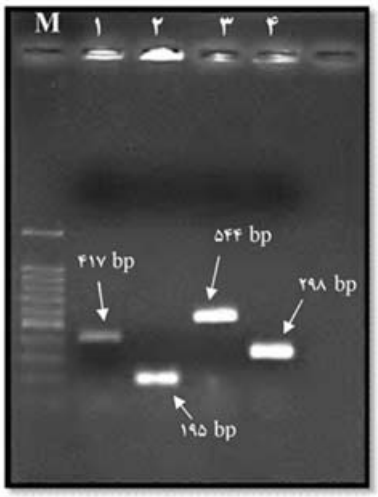


نمودار ۱- نتایج حداقل غلظت مهار کنندگی ماده بیوسایدی (MIC) بر روی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس (عدد اول از چپ به راست MIC و عدد دوم تعداد نمونه‌های ارائه دهنده آن MIC را نشان می‌دهد)

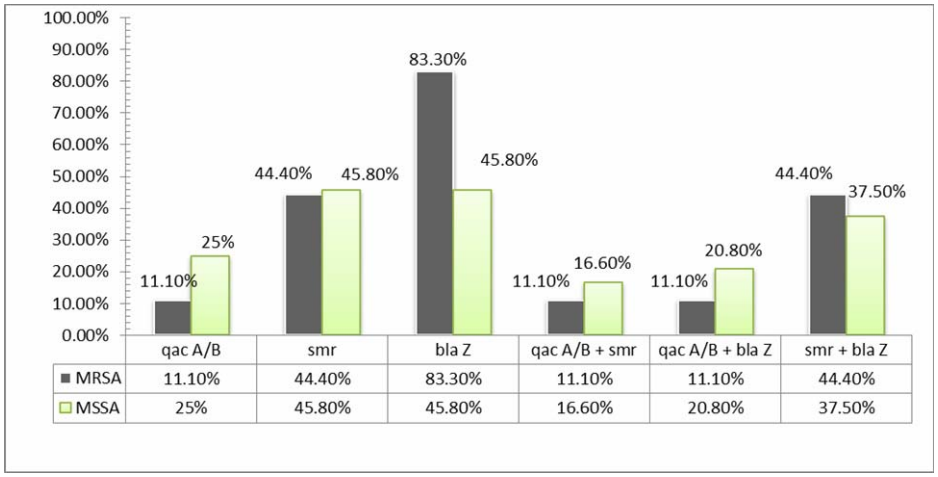
www.SID.ir

Archive of SID

ژن‌های qac A/B و smr به ترتیب در ۱۹/۰۴٪ و ۴۵/۲٪ از ۴۲ سویه کلینیکی استافیلوکوکوس اورئوس یافت شدند. فراوانی ژن‌های qac A/B و smr در۴۳ نمونه باقی، به ترتیب ۲/۳٪ و ۲۰/۹٪ بود، بطوریکه اختلاف معنی‌داری بین حضور ژن‌های qac A/B ($p_{qac\ A/B}$= ۰/۰۱۵) و smr (p_{smr}=۰/۰۲) در نمونه‌های کلینیکی و غیر کلینیکی بدست آمد. حضور ژن mec A تنها در نمونه‌های کلینیکی مشاهده شد که از نظر آماری معنی‌دار بود (P <۰/۰۵). از بین ۴۲ نمونه کلینیکی، ۱۸ نمونه حامل ژن mec A (۴۲/۸٪) و ۲۴ نمونه (۵۷/۱٪) فاقد آن بودند. جستجو برای یافتن ژن‌های اعطا کننده مقاومت به ماده بیوسایدی نیز حاکی از آن بود که تنها دو MRSA (۱۱/۱٪)، حامل ژن qac A/B بودند. این در حالی بود که در شش استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین (MSSA) ژن qac A/B (۲۵٪) یافت شد. یازده MSSA (۴۵/۸٪) و هشت MRSA (۴۴/۴٪) حامل ژن smr بودند، با این حال ارتباط آماری معنی‌داری بین حضور و یا عدم حضور ژن mec A با ژن‌های مقاومت بیوسایدی مشاهده نشد (نمودار ۲).



شکل ۲- ردیف (۱) ژن qac A/B، ردیف (۲) ژن smr، ردیف (۳) ژن mec A و ردیف (۴) ژن bla Z



نمودار ۲- میزان فراوانی ژن‌های qac A/B، smr، mec A و bla Z در نمونه‌های کلینیکی

بین حضور همزمان حداقل یکی از ژن‌های مقاومت بیوسایدی با ژن bla Z در نمونه‌های کلینیکی ارتباط معنی‌داری (p<۰/۰۴) مشاهده گردید، به طوری که از ۲۱ نمونه کلینیکیِ حامل حداقل یکی از ژن‌های اعطا کننده مقاومت بیوسایدی، ۱۸ نمونه حامل ژن bla Z بودند. وقوع همزمان ژن‌های qac A/B و smr در ۶ نمونه از ۴۲ نمونه کلینیکی (۱۴/۲٪) مشاهده شد.

نتایج PCR استافیلوکوکوس اورئوس‌های ایزوله شده از مواد لبنی غیر پاستوریزه (۱۱ نمونه) نشان داد که تنها یک نمونه (۹٪) که از شیر غیر پاستوریزه جداسازی شده بود، حامل ژن qac A/B بود. ژن smr نیز در ۴ نمونه (۳۶/۳۶٪) یافت شد. بین حضور همزمان حداقل یکی از ژن‌های اعطا کننده مقاومت بیوسایدی با ژن bla Z ارتباط معنی‌داری مشاهده شد (p<۰/۰۲۴). وقوع همزمان ژن‌های qac A/B و smr در یک نمونه (۹٪) مشاهده گردید.

نمونه‌هایی که از بینی افراد حاصل شده بودند، در مجموع ۳۲ نمونه بودند که ۵ مورد آنها حامل ژن smr (۱۵/۶٪) بودند. ژن qac A/B در هیچکدام از نمونه‌های بینی یافت نشد. ۲ نمونه از ۵ نمونه بینی (۴۰٪) حامل ژن smr نیز همزمان ژن bla Z را دارا بودند، اما ارتباط معنی‌داری از نظرحضور همزمان آنها حاصل نشد. علاوه بر دو نمونه فوق، حضور ژن bla Z به تنهایی در ۱۲ نمونه دیگر مشاهده شد (جدول ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- فراوانی ژن‌های مورد بررسی در نمونه های کلینیکی، مواد لبنی غیر پاستوریزه و نمونه های بینی

نمونه	qac A/B (تعداد) درصد	smr (تعداد) درصد	bla Z (تعداد) درصد	mec A (تعداد) درصد
نمونه‌های کلینیکی N=۴۲	۱۹/۰۴ (۸)	۴۵/۲ (۱۹)	۶۱/۹ (۲۶)	۴۲/۸ (۱۸)
نمونه‌های حاصل از مواد لبنی غیر پاستوریزه N=۱۱	۹/۰۹ (۱)	۳۶/۳۶ (۴)	۳۶/۳۶ (۴)	۰ (۰)
نمونه‌های بینی N=۳۲	۰ (۰)	۱۵/۶ (۵)	۴۳/۷ (۱۴)	۰ (۰)
مجموع N=۸۵	۱۰/۵ (۹)	۳۲/۹ (۲۸)	۵۱/۷ (۴۴)	۲۱/۱ (۱۸)

بحث

افزایش بروز عفونتهای ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس در بیمارستانها، منجر به افزایش آگاهی عمومی از تهدیدی گشته که توسط عفونتهای بیمارستانی ایجاد شده است. هرچند به نظر می‌رسد که بیوسایدها خط دفاعی اولیه جهت جلوگیری از گسترش عفونت هستند، امروزه توجهات زیادی به مصرف بیش از اندازه مواد بیوسایدی ضدمیکروبی که منجر به گزینش ارگانیزم‌های مقاوم به مواد آنتی‌بیوتیکی می‌شوند بوجود آمده است (۲۲).

از آنجایی که افراد سالم و حامل استافیلوکوکوس اورئوس، نقش مهمی در گسترش این باکتری به عهده داشته و می‌توانند به عنوان منبع عفونت تلقی شوند، در این مطالعه، بینی ۷۱ فرد داوطلب سالم از جهت حضور این باکتری مورد بررسی قرار گرفت. آنچه که باعث تمایز مطالعه حاضر از مطالعات سایر محققان شده است، بررسی حضور ژن‌های مقاومت و همینطور سنجش حساسیت سویه‌های بدست آمده از بینی نسبت به ماده بیوسایدی حاوی QACs بوده است. نتایج این بررسی نشان داد که از ۷۱ فرد مورد مطالعه، ۳۲ نفر (۴۵٪) حامل استافیلوکوکوس اورئوس در بینی خود بودند. حضور ژن mec A در میان این دسته از باکتری‌ها یافت نشد. در این مطالعه، از ۳۲ فرد حامل استافیلوکوکوس اورئوس در بینی، ۵ نمونه (۱۵/۶٪) حامل ژن smr بودند. حضور ژن smr در نمونه‌های بینی افراد سالم ممکن است به علت فشار انتخابی باشد که بدنبال مصرف مواد بیوسایدی مورد مصرف عام همانند لوازم آرایشی- بهداشتی حاصل شده است که به طرز اجتناب ناپذیری با پوست و سطوح مخاطی در تماس‌اند. نتایج محققان دیگری همچون Hegstad و همکارانش نیز بر این موضوع تاکید دارد (۲۳).

در مطالعه اخیر، کیفیت اثر بیوساید سورفانیوس سیترون حاوی ترکیبات چهارتایی آمونیوم علیه ۸۵ استافیلوکوکوس اورئوس سنجیده شد. کمینه محدوده MIC نسبت به ماده بیوسایدی متعلق به سویه کنترل استاندارد و بیشینه آن مربوط به سویه‌های حامل هر دو ژن مقاومت به ماده بیوسایدی بود. سویه‌هایی از استافیلوکوکوس اورئوس که MICشان در محدوده ۱/۹۵-۷/۸۱ µg/ml بودند، به عنوان سویه‌های مقاوم با حساسیت کاهش یافته به ماده بیوسایدی قلمداد شدند که ۵۰٪ از نمونه‌های کلینیکی، ۳۶/۳۶٪ از نمونه‌های حاصل از مواد لبنی و ۱۵/۶٪ از نمونه‌های بینی بودند که در مجموع ۳۵/۲٪ از مجموع ۸۵ نمونه مورد مطالعه را تشکیل می‌دادند. در سال ۲۰۰۲ نیز Sidhu و همکارانش حساسیت ۲۳۸ استافیلوکوکسی به دست آمده از منابع کلینیکی را نسبت به QACs سنجیدند (۴). ۱۱۸ سویه (۴۹/۵٪) با محدوده MIC بین ۸-۳ µg/ml به عنوان مقاوم به بنزالکونیوم کلراید (از ترکیبات چهارتایی آمونیوم) گزارش شدند که با مطالعه حاضر همخوانی داشت.

در سال ۲۰۰۱ Bjorland و همکاران تحقیقات مشابهی را بر روی ۵۵ استافیلوکوکوس اورئوس ایزوله شده از شیر دام انجام دادند و حساسیت آنها را نسبت به بنزالکونیوم کلراید (از ترکیبات چهارتایی آمونیوم) سنجیدند (۲۴). از نتایج این تحقیق، یافتن ۳ استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به بنزالکونیوم کلراید (۴/۵٪) با MIC ۳-۲/۵ µg/ml بود. استافیلوکوکوس اورئوس‌هایی با MIC ۱-۰/۵ µg/ml نیز حساس به بنزالکونیوم کلراید گزارش شدند. فراوانی بیشتر سویه‌های مقاوم در مطالعه حاضر را می‌توان به علت تفاوت در نوع و غلظت ماده بیوسایدی مصرفی، فاصله زمانی انجام دو مطالعه و اثر متفاوت ماده بیوسایدی بر روی سویه‌های اپیدمیک هر منطقه دانست.

تمامی نمونه‌های مورد مطالعه در این بررسی دارای MBC کمتر از ۰/۰۱٪ (w/v) یعنی حدود ۱۰ تا ۱۰۰ بار کمتر از غلظت مصرفی توصیه شده توسط تولید کننده بودند. این بدین معناست که چنانچه این بیوساید مطابق با دستورالعمل تولید کننده مصرف گردد ۱۰۰٪ باکتری‌ها می‌بایست کشته شوند. در مراکز بهداشتی مشکل از آنجا ناشی می‌شود که بیوسایدها به نادرستی استفاده می‌شوند. مانند مواردی که قبل از مصرف بیوساید سطوح از مواد آلی به خوبی عاری نگشته و در نتیجه باعث کاهش اثر بهینه ماده بیوسایدی می‌شود. از سوی دیگر رشد باکتری‌ها به شکل بیوفیلم بر روی سطوح در بیمارستانها، آنها را قادر می‌سازد ۱۰ تا ۱۰۰۰ برابر، قدرت تحمل خود را به بیوسایدها افزایش دهند که در نتیجه عاملی

www.SID.ir

Archive of SID

مهم در شکست روند استفاده از بیوسایدها جهت ضدعفونی کردن مراکز بهداشتی تلقی می‌گردد. در سال ۲۰۰۸، Smith، MBC ۹۴ سویه از استافیلوکوکوس اورئوس را نسبت به ماده بیوسایدی Trigene (حاوی دی دسیل دی متیل آمونیوم کلراید) سنجید (۳). طبق آزمایشهای وی مشخص شد که تمام نمونه‌های مورد مطالعه او MBC کمتر از ۰/۰۱٪ (w/v) نسبت به ماده بیوسایدی داشتند. نتایج بدست آمده از مطالعات Smith با نتایج بدست آمده از این بررسی مطابقت داشت.

در مطالعه حاضر ژن‌های qac A/B، smr وbla Z به ترتیب در ۱۹/۰۴٪، ۴۵/۲٪ و ۶۱/۹٪ از استافیلوکوکوس اورئوس‌های بدست آمده از منابع کلینیکی یافت شدند. این در حالی بود که میزان وقوع ژن‌های qac A/B، smr و bla Z در ۴۳ نمونه باقی به ترتیب ۲/۳٪، ۲۰/۹٪ و ۴۱/۸٪ بود. گسترش کمتر ژن‌های اعطا کننده مقاومت به QACs در میان نمونه‌های غیر کلینیکی بدست آمده از این مطالعه را می‌توان به علت مصرف کمتر مواد ضد میکروبی در محیطهایی غیر از مراکز درمانی و بیمارستانها و در نتیجه کاهش فشار انتخابی از سوی مواد بیوسایدی دانست. با این حال نباید از نظر دور داشت که وجود ژن‌های اعطا کننده مقاومت در نمونه‌های غیرکلینیکی نیز ممکن است به گزینش باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک منجر گردد. از این رو نیاز است که آزمایشهای بیشتری در زمینه جزئیات اثر مجاورت مداوم باکتری‌ها با غلظتهای کم مواد بیوسایدی صورت گیرد.

در سال ۲۰۰۸، Vali و همکاران، وجود ژن‌های اعطا کننده مقاومت به مواد ضد میکروبی نظیر ترکیبات چهارتایی آمونیوم و بتالاکتام‌ها را در میان ۱۲۰ سویه کلینیکی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) بررسی کردند (۱). نتایج تحقیق آنها حاکی از حضور ژن‌های qac A/B، smr و bla Z به ترتیب با فراوانی ۸/۳٪، ۴۴/۲٪ و ۹۷/۵٪ در استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین بود (۱). این نتایج، با فراوانی ۱۱/۱٪ ژن qac A/B، ۴۴/۴٪ ژن smr و ۸۳/۳٪ ژن bla Z در استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین که از بررسی حاضر بدست آمده بود مطابقت داشت.

در آزمایش مشابهی که Smith و همکارانش در سال ۲۰۰۸ انجام دادند (۳)، میزان فراوانی ژن qac A/B، از مجموع ۹۴ استافیلوکوکوس اورئوس کلینیکی، ۱۴/۸٪ گزارش شد که با فراوانی ۱۹٪ ژن qac A/B در این بررسی همخوانی داشت. در سال ۱۹۹۹ Noguchi و همکاران، میزان رخداد ژن‌های qac A/B را در ۹۸ استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، ۱۰٪ گزارش کردند که با فراوانی ۱۱/۱٪ ژنqac A/B بدست آمده از این بررسی مطابقت داشت. Noguchi در همین مطالعه فراوانی ژن smr را ۲۰٪ گزارش کرد که همانند مطالعه اخیر با فراوانی بیشتر نسبت به ژن qac A/B یافت شد. در سال ۲۰۰۵ Noguchi و همکاران مطالعه گسترده‌تری ترتیب دادند (۹). آنها حساسیت ۸۹۴ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین را که از ۱۱ کشور آسیایی جمع آوری شده بود نسبت به مواد بیوسایدی کاتیونی از جمله ترکیبات چهارتایی آمونیوم سنجیدند و حضور ژن‌های اعطا کننده مقاومت به این مواد بیوسایدی را نیز مورد مطالعه قرار دادند. از نتایج بدست آمده از بررسیهای آنها، حضور ۳۸/۵٪ ژن qac A/B و ۲۸٪ ژن smr در کل نمونه‌های جمع آوری شده بود. در بین ۱۱ کشور آسیایی مورد مطالعه Noguchi و همکاران، کشور هند با فراوانی۳۱/۶٪ ژن smr در مقابل فراوانی ۲/۶٪ ژن qac A/B، بالاترین رخداد ژن smr را دارا بود. در باقی کشورها این ژن qac A/B بود که در میان سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین با فراوانی بیشتر یافت شد. بالاترین میزان فراوانی ژن qac A/B، ۷۲/۴٪ بود که به کشور سنگاپور تعلق داشت که بسیار فراتر از فراوانی ۱۱/۱٪ ژن qac A/B بدست آمده از مطالعه حاضر بود. بررسی میزان گسترش ژن‌های اعطا کننده مقاومت به مواد بیوسایدی در اروپا نیز توسط Mayer بصورت گسترده در سال ۲۰۰۱ با مطالعه بر روی ۴۹۷ استافیلوکوکوس اورئوس جمع آوری شده از ۱۴ کشور اروپایی انجام گرفت (۱۹). او میزان حضور ژن‌های qac A/B و smr را به ترتیب ۴۲٪ و ۵/۸٪ عنوان کرد که با نتایج بدست آمده از این بررسی همخوانی نداشت. تفاوتهای موجود در میزان فراوانی ژن‌های اعطا کننده مقاومت در مناطق مختلف که ذکر آنها رفت را می‌توان به علت اختلاف در گسترش اپیدمیک سویه‌های باکتریایی در مناطق مختلف، انتخاب جمعیتهای متفاوت جهت مطالعه و یا وجود انواع گوناگون از مواد بیوسایدی مورد مصرف با غلظتهای متنوع از مواد ضد میکروبی دانست که موجب ایجاد فشار انتخابی متفاوت بر روی سویه‌های باکتریایی هر منطقه می‌شوند.

حضور همزمان ژن‌های qac A/B و smr از دیگر موضوعات مورد بررسی در این مطالعه بود. نتایج این بررسی از وقوع همزمان این دو ژن در ۶ نمونه از ۴۲ نمونه کلینیکی (۱۴/۲٪) و ۱ نمونه از ۱۱ نمونه حاصل از مواد غذایی و لبنی (۹٪) حکایت داشت. حضور همزمان این دو ژن در ۳۲ سویه دیگر مشاهده نشد. وقوع همزمان این دو ژن بیش از فراوانی ۱٪ بود

www.SID.ir

Archive of SID

که Mayer در سال ۲۰۰۱ در استافیلوکوکوس اورئوس‌های کلینیکی گزارش کرده بود (۱۹). همچنین این میزان، از فراوانی ۳/۱٪ که Noguchi در مجموع ۱۱ کشور آسیایی بدست آورده بود بیشتر بود. از بین کشورهای مورد مطالعه Noguchi، سنگاپور با دارا بودن بالاترین فراوانی وقوع همزمان این دو ژن یعنی ۱۳/۸٪ در استافیلوکوکوس اورئوس‌های کلینیکی، بیشترین مطابقت را با نتایج مطالعه حاضر داشت (۹). حضور همزمان دو ژن qac، خود یک مزیت انتخابی است که در یک سویه باکتریایی می‌تواند باعث محافظت بیشتر باکتری در برابر محدوده وسیعتری از مواد بیوسایدی در مقایسه با وجود تنها یک سیستم دفعی در باکتری گردد.

نکته قابل توجه دیگر در این بررسی، وقوع همزمان ژن‌های اعطا کننده مقاومت به مواد بیوسایدی با ژن bla Z بود که هم در نمونه‌های کلینیکی و هم در استافیلوکوک‌های بدست آمده از مواد لبنی غیر پاستوریزه به طرز قابل توجهی بارز بود، بطوریکه به ترتیب ۸۷/۵٪ و ۱۰۰٪ از نمونه‌های کلینیکی و نمونه‌های بدست آمده از مواد لبنی غیر پاستوریزه و حامل ژن qac A/B، همزمان ژن bla Z را نیز دارا بودند. حضور همزمان این ژن‌ها، نشاندهنده آن است که می‌تواند ارتباطی بین مقاومت به QACs و مقاومت به پنی‌سیلین‌ها در میان استافیلوکوک‌ها وجود داشته باشد که به گزینش همزمان این دو، به دنبال درمان آنتی بیوتیکی و یا در پی مصرف QACs جهت ضدعفونی کردن منجر شده است.

در آزمایشی مشابه در سال ۲۰۰۸، حضور همزمان دو ژن qac A/B و bla Z در تمامی ۱۰ سویه کلینکی مقاوم به QACs مشاهده شد (۱). نتایج Bjorland نیز از دیگر مواردی بود که با گزارش حضور همزمان دو ژن qac A/B و bla Z در ۷۵٪ از استافیلوکوکسی‌های حامل ژن qac A/B و حاصل از شیر دام، با مطالعه حاضر همخوانی داشت (۷). در بررسی Sidhu و همکاران نیز در سال ۲۰۰۲، ارتباط ژنتیکی و سیستماتیکی بین مقاومت به بنزالکونیوم کلراید و پنی‌سیلین یافت شد، بطوریکه حدود نیمی از مقاومت بتالاکتامازی کد شده بر روی پلاسمید (۴۴٪) به ژن‌های مقاومت به ماده بیوسایدی مربوط می‌شدند (۴). مطالعه حاضر با گزارش فراوانی بیشتر و تأکید مضاعف بر ارتباط مقاومت به QACs و مقاومت به پنی‌سیلین‌ها با مطالعه Sidhu و همکاران همخوانی داشت. محققان دیگری همچون Langsrud و Chapman نیز بر وجود ارتباط بین مصرف مواد بیوسایدی و مقاومت متقاطع با آنتی بیوتیک‌ها تأکید دارند (۲۵ و۲۶).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش، نه تنها برای اولین بار در ایران حضور ژن‌های qac A/B و smr را در استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار داده است، بلکه این نخستین بار است که حضور ژن smr در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جداسازی شده از بینی با فراوانی بالا گزارش شده است که نیاز به توجه و تحقیق بیشتر در زمینه نوع و همچنین میزان ماده بیوسایدی مصرفی در محصولات بیوسایدی مورد مصرف عام را طلب می‌کند.

از سوی دیگر در بررسی حاضر ارتباط قابل توجهی بین مقاومت به QACs و مقاومت به پنی سیلین بدست آمد. این موضوع مبین این مطلب است که تکامل، همچنان روندی پویا و محافظه کار دارد و استراتژی‌های موفق را برمی‌گزینند. در نتیجه حضور هر کدام از این شاخص‌های مقاومت می‌تواند به گزینش مشترک این دو بدنبال درمان آنتی بیوتیکی و یا بدنبال مصرف مواد ضد عفونی کننده حاوی ترکیبات چهارتایی آمونیوم منجر گردد. از این رو، حضور ژن‌های qac در میان جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس و توانایی آنها در توسعه مقاومت بیولوژیکی‌شان و احتمال بروز مقاومت متقاطع با آنتی بیوتیک‌ها، اهمیت استراتژی‌های کنترل عفونت مؤثر و استفاده از مواد بیوسایدی در غلظت توصیه شده را تأکید می‌نماید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از خانم فلور مظهر، کارشناس ارشد میکروبیولوژی و سایر کارکنان آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، واقع در محمودیه، مراتب قدردانی و تشکر به عمل می‌آید.

REFERENCES

1. Vali L, Davies SE, Lai LL, Dave J, Amyes SG. Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. J Antimicrob Chemother 2008;61(3):524–32.
2. Saxena S, Gomber C. Surmounting antimicrobial resistance in the millennium superbug: Staphylococcus aureus. Cent Eur J Med 2010;5(1):12–29.
3. Smith K, Gemmell CG, Hunter IS. The association between biocide tolerance and the presence or absence of qac genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates. J Antimicrob Chemother 2008;61(1):78–84.

www.SID.ir

Archive of SID

4. Sidhu MS, Heir E, Leegaard T, Wiger K, Holck A. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 2002;46(9):2797-803.
5. Noguchi N, Nakaminami H, Nishijima S, Kurokawa I, So H, Sasatsu M. Antimicrobial agent of susceptibilities and antiseptic resistance gene distribution among methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from patients with impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. J Clin Microbiol 2006;44(6):2119-25.
6. Russell AD, Suller MT, Maillard JY. Do antiseptics and disinfectants select for antibiotic resistanc? J Med Microbiol 1999;48(7):613–5.
7. Bjorland J, Steinum T, Kvitle B, Waage S, Sunde M, Heir E. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. J Clin Microbiol 2005;43(9):4363-8.
8. Sekiguchi JI, Hama T, Fujino T, Araake M, Irie A, Saruta K, et al. Detection of the antiseptic- and disinfectant-resistant genes qacA, qacB and qacC in methicilin resistant Staphylococcus aureus isolated in a Tokyo Hospital. Jpn J Infect Dis 2004;57(6):288-91.
9. Noguchi N, Suwa J, Narui K, Sasatsu M, Ito T, Hiramatsu K, et al. Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic-resistance genes qacA/B and smr of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated in Asia during 1998 and 1999. J Med Microbiol 2005;54(Pt 6):557-65.
10. Noguchi N, Hase M, Kitta M, Sasatsu M, Deguchi K, Kono M. Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. FEMS Microbiol Lett 1999;172(2):247-53.
11. Russell AD, Tattawasart U, Maillard JY, Furr JR. Possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides. Antimicrob Agents Chemother 1998;42(8):2151.
12. Akimitsu N, Hamamoto H, Inoue R, Shoji M, Akamine A, Takemori K, et al. Increase in resistance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus to beta-lactams caused by mutations conferring resistance to benzalkonium chloride, a disinfectant widely used in hospitals. Antimicrob Agents Chemother 1999;43(12):3042–3.
13. Walsh SE, Maillard JY, Russell AD, Catrenich CE, Charbonneau DL, Bartolo RG. Development of bacterial resistance to several biocides and effects on antibiotic susceptibility. J Hosp Infect 2003;55(2):98–107.
14. Cavides L, Delgado J, Gilman RH. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 2002;40(5):1873–4.
15. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement. CLSI document M100-S17. PA: 2007.
16. Mohammadzadeh A, Farnia P, Ghazvini K, Behdani M, Rashed T, Ghanaat J. Rapid and low-cost colorimetric method using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride for detection of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. J Med Microbiol 2006;55(Pt 12):1657-9.
17. Lee DD, Lee1 EY, Jeong SH, Chang CL. Evaluation of a colorimetric broth microdilution method for antimicrobial susceptibility testing using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. Korean J Clin Microbiol 2007;l0(1):49-53.
18. Lee SM, Kim J, Jeong J, Park YK, Bai GH, Lee EY, et al. Evaluation of the broth microdilution method using 2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride for rapidly growing mycobacteria susceptibility testing. J Korean Med Sci 2007;22:784–90.
19. Mayer S, Boos M, Beyer A, Fluit AC, Schmitz FJ. Distribution of the antiseptic resistance genes qacA, qacB and qacC in 497 methicillin-resistant and -susceptible European isolates of Staphylococcus aureus. J Antimicrob Chemother 2001;47(6):896–7.
20. Sasatsu M, Shima K, Shibata Y, Kono M. Nucleotide sequence of a gene that encodes resistance to ethidium bromide from a transferable plasmid in Staphylococcus aureus. Nucleic Acids Res 1989;17(23):10103.
21. Lambert RJ, Joynson J, Forbes B. The relationships and susceptibilities of some industrial, laboratory and clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa to some antibiotics and biocides. J Appl Microbiol 2001;91(6):972–84.
22. Lambert RJ. Comparative analysis of antibiotic and antimicrobial biocide susceptibility data in clinical isolates of methicillin-sensitive Staphylococcus aureus, methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa between 1989 and 2000. J Appl Microbiol 2004;97(4):699–711.
23. Hegstad K, Langsrud S, Lunestad BT, Scheie AA, Sunde M, Yazdankhah SP. Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? Microb Drug Resist 2010;16(2):91-104.
24. Bjorland J, Sunde M, Waage S. Plasmid-borne smr gene causes resistance to quaternary ammonium compounds in bovine Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 2001;39(11):3999-4004.
25. Langsrud S, Sidhu MS, Heir E, and Holck AL. Bacterial disinfectant resistance—a challenge for the food industry. Int Biodeterior Biodegradation 2003;51(4)**:**283–90.
26. Chapman JS. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance and co-resistance. Int Biodeterior Biodegradation 2003;51(4):271–6.

www.SID.ir