

صلاة الاضلاع



دانشکده دامپزشکی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی باکتری شناسی
تأثیر ضد عفونی کننده‌های کلرهگزیدین و بنزالکونیوم کلراید بر
تشکیل بیوفیلم برخی از باکتری‌های بیماری‌زای دامپزشکی

استاد راهنما:

دکتر عزیزاله ابراهیمی

استادان مشاور:

دکتر سعید حبیبیان دهکردی

دکتر شهاب بهادران

پژوهشگر:

مجید همتی

مهر ماه ۱۳۹۲



دانشکده دامپزشکی

گروه پاتوبیولوژی

پایان نامه آقای مجید همتی جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته باکتری شناسی با عنوان تأثیر ضد عفونی کننده های کلرهگزیدین و بنزالکونیوم بر تشکیل بیوفیلم برخی از باکتری های بیماری زای دامپزشکی در تاریخ ۹۲/۰۷/۰۳ با حضور هیأت داوران زیر بررسی و با رتبه/نمره مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

۱. استاد راهنمای پایان نامه:

دکتر عزیزاله ابراهیمی با مرتبه علمی استادیار امضاء

۲. استادان مشاور پایان نامه:

دکتر سعید حبیبیان دهکردی با مرتبه علمی دانشیار امضاء

دکتر شهاب بهادران با مرتبه علمی استادیار امضاء

۳. استادان داور پایان نامه:

دکتر محمدرضا محزونیه با مرتبه علمی دانشیار امضاء

دکتر مریم عباس والی با مرتبه علمی استادیار امضاء

مسئولیت کلیه عقاید و نظراتی که در این پایان نامه آورده شده است به عهده نگارنده بوده و دانشکده دامپزشکی هیچ مسئولیتی را در این زمینه تقبل نمی نماید.

دکتر سعید حبیبیان دهکردی دکتر ناصر شمس اسفند آبادی

معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی رییس دانشکده دامپزشکی

کلیه حقوق مادی حاصل از نتایج مطالعات، ابتکارات
و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

از استاد با کمالت و شایسته؛ جناب آقای دکتر ابراهیمی که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از ابتدای راه و در طی انجام این تحقیق، از بیچ کلی در این عرصه بر من دریغ نمودند و زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده گرفتند صمیمانه قدردانی می‌کنم.

از استادان گرامی، جناب آقای دکتر حسینیان و جناب آقای دکتر بهادران که زحمت مشاوره این پایان نامه را در حالی متقبل شدند که بدون مساعدت ایشان، این پروژه به نتیجه مطلوب نمی‌رسید سپاسگزارم.

از استاد دلسوز؛ جناب آقای دکتر محزونیه که از محضر پر فیض تدریستان، بهره‌ها بردم و سرکار خانم دکتر عباس والی که زحمت داوری این پایان نامه را متقبل شدند؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم.

ماحصل آموخته‌هایم را تقدیم می‌کنم به والدینی که بودندشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی
بر بودنم،

پدر و مادر عزیز و مهربانم که در سختی‌ها و دشواری‌های زندگی، همواره یآوری دلسوز و فداکار و پشتیبانی محکم و
مطمئن برایم بوده‌اند.

و تقدیم به همه‌ی آن‌هایی که دوستشان دارم و...

چکیده

یکی از مسائل مهم در علوم باکتریولوژی، شناسایی یا تشخیص بیوفیلیم و درمان متعاقب آن می‌باشد. این پدیده ممکن است حضور بیماری‌های مزمنی را توضیح دهد که می‌توانند دوره‌ی مزمن را ادامه دهند و نسبت به درمان‌ها با عاملان ضد میکروبی مقاوم بمانند. بسیاری از پاتوژن‌های باکتریایی شایع در حیوانات نیز به عنوان ایجاد کننده‌ی بیوفیلیم مطرح هستند. بررسی حاضر با هدف ارزیابی تأثیر دو ضد عفونی کننده‌ی بنزالکونیوم کلراید و کلرهگزیدین روی جدایه‌های باکتریایی ۴ جنس /شریشیا کلای، سالمونلا، استافیلوکوکوس ارئوس و استرپتوکوکوس آگالاکتیه انجام شد. به این منظور ۶۴ باکتری مورد بررسی قرار گرفت. از این تعداد، ۵۹ مورد (۹۲٪) تولید بیوفیلیم کردند. از هر جنس ۱۰ باکتری که بیوفیلیم قوی‌تری ایجاد کرده بوند انتخاب شد. میانگین MIC ضد عفونی کننده‌ی بنزالکونیوم کلراید برای باکتری‌های /شریشیا کلای، سالمونلا، استافیلوکوکوس ارئوس و استرپتوکوکوس آگالاکتیه به ترتیب ۰/۰۴۷، ۰/۰۳، ۰/۱۲۵ و ۰/۱۲۵ درصد و برای ضد عفونی کننده‌ی کلرهگزیدین به ترتیب ۰/۰۰۹، ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۲ و ۰/۰۰۲ درصد تعیین شد. رشد مرئی پلانکتونی، در باکتری‌های /شریشیا کلای، سالمونلا، استافیلوکوکوس ارئوس و استرپتوکوکوس آگالاکتیه در حضور بنزالکونیوم کلراید به ترتیب ۷، ۷، ۸ و ۹ جدایه در غلظت $MIC \times 1/4$ و بعد از آن بود. این نتایج در مورد ضد عفونی کننده‌ی کلرهگزیدین به ترتیب ۷، ۶، ۷ و ۸ جدایه در غلظت $MIC \times 1/4$ و بعد از آن بود. در مورد تشکیل بیوفیلیم نیز با کاهش غلظت MIC، میزان تولید بیوفیلیم، افزایش چشم گیری پیدا کرد. نتایج به دست آمده نشان دادند که مادامی‌که ضد عفونی کننده‌های کاتیونی در غلظت‌های مناسب مورد استفاده قرار بگیرند می‌توانند از رشد و توسعه‌ی بیوفیلیم گونه‌های مختلف باکتریایی جلوگیری کنند. اما قرار گرفتن میکروارگانیسم‌ها در معرض ضد عفونی کننده‌ها در غلظت زیر MIC می‌تواند به ظهور سویه‌های مقاوم در برابر آن‌ها منجر شود.

کلمات کلیدی: بیوفیلیم، بنزالکونیوم کلراید، کلرهگزیدین، /شریشیا کلای، سالمونلا، استافیلوکوکوس ارئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه.

فهرست مطالب

شماره صفحه

عنوان

| | |
|----|---|
| ۵ | فصل اول - مقدمه |
| ۷ | فصل دوم - کلیات |
| ۷ | ۱-۲- اهمیت و نقش ضدعفونی کننده |
| ۷ | ۱-۱-۲- عوامل مؤثر بر فعالیت ضدعفونی کننده‌ها |
| ۸ | ۱-۱-۱-۲- مواد آلی |
| ۸ | ۲-۱-۱-۲- شکل و تعداد اجرام |
| ۸ | ۳-۱-۱-۲- غلظت ماده‌ی ضد عفونی کننده |
| ۸ | ۴-۱-۱-۲- زمان |
| ۹ | ۵-۱-۱-۲- سایر عوامل |
| ۹ | ۲-۱-۲- خصوصیات یک ماده‌ی ضدعفونی کننده‌ی ایده آل |
| ۹ | ۲-۲- انواع ضدعفونی کننده |
| ۱۰ | ۱-۲-۲- فنل و فنلیک‌ها |
| ۱۱ | ۲-۲-۲- هالوژن‌ها |
| ۱۱ | ۳-۲-۲- ترکیبات آمونیوم چهارگانه |
| ۱۱ | ۴-۲-۲- بنزالکونیوم کلراید |
| ۱۲ | ۱-۴-۲-۲- ویژگی‌ها |
| ۱۲ | ۲-۴-۲-۲- کاربردها |
| ۱۲ | ۳-۴-۲-۲- فعالیت بیولوژیکی |
| ۱۲ | ۵-۲-۲- کلرهگزیدین |
| ۱۳ | ۱-۵-۲-۲- کاربردها |
| ۱۳ | ۲-۵-۲-۲- فعالیت بیولوژیکی |
| ۱۳ | ۶-۲-۲- کرووزول |
| ۱۳ | ۷-۲-۲- روغن کاج |
| ۱۳ | ۸-۲-۲- پودر ضدعفونی کننده‌ی پتاسیم سولفات |
| ۱۳ | ۳-۲- روش‌های ارزیابی قدرت ضد باکتریایی |
| ۱۴ | ۱-۳-۲- روش‌های ارزیابی قدرت ضد باکتریایی ماده‌ی ضدعفونی کننده |
| ۱۴ | ۲-۳-۲- شکل و چارچوب آزمون‌ها |
| ۱۴ | ۱-۲-۳-۲- خارج بدن موجود زنده (In vitro) |
| ۱۵ | ۲-۲-۳-۲- روش عملی |
| ۱۵ | ۳-۲-۳-۲- مطالعه در محل (in use) |
| ۱۵ | ۴-۲- بیوفیلم |
| ۱۵ | ۱-۴-۲- تاریخچه |
| ۱۶ | ۲-۴-۲- شیوع بیوفیلم در انسان و حیوانات |

| | |
|----|--|
| ۱۶ | ۳-۴-۲ چرا میکروارگانسیم ها بیوفیلیم تشکیل می دهند؟ |
| ۱۶ | ۴-۴-۲ ترکیب و تشکیل بیوفیلیم |
| ۱۶ | ۵-۴-۲ جدا شدن و پراکندگی بیوفیلیم |
| ۱۸ | ۶-۴-۲ بیماری زایی بیوفیلیم ها |
| ۱۸ | ۷-۴-۲ تحمل بیوفیلیم به داروهای ضد میکروبی |
| ۱۹ | ۸-۴-۲ القای مقاومت فنوتیپی بیوفیلیم به آنتی بیوتیک ها |
| ۲۰ | ۹-۴-۲ اهمیت بالینی بیوفیلیم باکتریایی |
| ۲۱ | ۱۰-۴-۲ مدیریت عفونت بیوفیلیم |
| ۲۱ | ۱۱-۴-۲ بیوفیلیم و بیماری های دامپزشکی |
| ۲۲ | ۵-۲ استرپتوکوکوس |
| ۲۳ | ۶-۲ استافیلوکوکوس |
| ۲۴ | ۷-۲ اشریشیا کلای |
| ۲۵ | ۸-۲ سالمونلا |
| ۲۷ | فصل سوم- مواد و روش کار |
| ۲۷ | ۱-۳ مواد و وسایل مورد استفاده در این مطالعه |
| ۲۷ | ۲-۳ جمع آوری نمونه ها |
| ۲۷ | ۳-۳ محیط های مورد استفاده جهت جداسازی باکتری ها |
| ۲۸ | ۴-۳ جداسازی باکتری اشریشیا کلای |
| ۲۹ | ۵-۳ جداسازی باکتری سالمونلا |
| ۲۹ | ۶-۳ جداسازی باکتری های استافیلوکوکوس ارئوس و استرپتوکوکوس آگالاکتیه |
| ۲۹ | ۷-۲ آزمایش بیوفیلیم |
| ۳۰ | ۸-۲ تعیین MIC ضد عفونی کننده ها |
| ۳۰ | ۹-۲ آزمایش تأثیر ضد عفونی کننده ها بر رشد پلانکتونی و تشکیل بیوفیلیم |
| ۳۲ | فصل چهارم- نتایج |
| ۴۳ | فصل پنجم- بحث |
| ۵۰ | فصل ششم- منابع |

فهرست شکل‌ها

| عنوان | شماره صفحه |
|---|------------|
| شکل ۱-۲ - پراگندگی (انتشار) باکتری از بیوفیلم..... | ۲۱ |
| شکل ۱-۴ - میزان رشد پلانکتونی باکتری‌ها در حضور ضدعفونی کننده‌ی بنزالکونیوم کلراید..... | ۳۷ |
| شکل ۲-۴ - میزان رشد پلانکتونی باکتری‌ها در حضور ضدعفونی کننده‌ی کلرهگزیدین..... | ۳۷ |
| شکل ۳-۴ - میزان تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها در حضور ضدعفونی کننده‌ی بنزالکونیوم کلراید..... | ۳۸ |
| شکل ۴-۴ - میزان تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها در حضور ضدعفونی کننده‌ی کلرهگزیدین..... | ۳۸ |

فهرست جدول‌ها

| شماره صفحه | عنوان |
|------------|---|
| ۳۲..... | جدول ۴-۱- الگوی تشکیل بیوفیلم در نمونه‌های مورد آزمایش..... |
| ۳۳..... | جدول ۴-۲- میانگین MIC ضد عفونی کننده‌های بنزالکونیوم کلراید و کلرهگزیدین..... |
| ۳۳..... | جدول ۴-۳- رشد پلانکتونی باکتری‌ها در حضور ضد عفونی کننده‌ی بنزالکونیوم کلراید..... |
| ۳۴..... | جدول ۴-۴- رشد پلانکتونی باکتری‌ها در حضور ضد عفونی کننده‌ی کلرهگزیدین..... |
| ۳۵..... | جدول ۴-۵- تجزیه واریانس تاثیر ضد عفونی کننده‌ی بنزالکونیوم کلراید روی رشد پلانکتونی باکتری‌ها..... |
| ۳۵..... | جدول ۴-۶- تجزیه واریانس تاثیر ضد عفونی کننده‌ی کلرهگزیدین روی رشد پلانکتونی باکتری‌ها..... |
| ۳۶..... | جدول ۴-۷- تجزیه واریانس تاثیر ضد عفونی کننده‌ی بنزالکونیوم کلراید روی تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها..... |
| ۳۶..... | جدول ۴-۸- تجزیه واریانس تاثیر ضد عفونی کننده‌ی کلرهگزیدین روی تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها..... |
| ۳۹..... | جدول ۴-۹- درصد افزایش OD در غلظت های مختلف بنزالکونیوم کلراید نسبت به غلظت MIC در باکتری‌های /شیریشیا کلای در مرحله‌ی رشد پلانکتونی..... |
| ۴۰..... | جدول ۴-۱۰- درصد افزایش OD در غلظت های مختلف بنزالکونیوم کلراید نسبت به غلظت MIC در باکتری‌های سالمونلا در مرحله‌ی رشد پلانکتونی..... |
| ۴۰..... | جدول ۴-۱۱- درصد افزایش OD در غلظت های مختلف بنزالکونیوم کلراید نسبت به غلظت MIC در باکتری‌های استافیلوکوکوس /رئوس در مرحله‌ی رشد پلانکتونی..... |
| ۴۱..... | جدول ۴-۱۲- درصد افزایش OD در غلظت های مختلف بنزالکونیوم کلراید نسبت به غلظت MIC در باکتری‌های /شیریشیا کلای در مرحله‌ی تشکیل بیوفیلم..... |
| ۴۱..... | جدول ۴-۱۳- درصد افزایش OD در غلظت های مختلف بنزالکونیوم کلراید نسبت به غلظت MIC در باکتری‌های سالمونلا در مرحله‌ی تشکیل بیوفیلم..... |
| ۴۲..... | جدول ۴-۱۴- درصد افزایش OD در غلظت های مختلف بنزالکونیوم کلراید نسبت به غلظت MIC در باکتری‌های استافیلوکوکوس /رئوس در مرحله‌ی تشکیل بیوفیلم..... |
| ۴۲..... | جدول ۴-۱۵- درصد افزایش OD در غلظت های مختلف کلرهگزیدین نسبت به غلظت MIC در باکتری‌های سالمونلا در مرحله‌ی تشکیل بیوفیلم..... |

فصل اول

مقدمه

به اجتماع یا ماتریکس پیچیده از میکروارگانیسم‌ها و تولیدات میکروبی آن‌ها که به سطحی متصل شده باشند بیوفیلم (Biofilm) می‌گویند [۱۲۱]. اکثر عفونت‌های حاد، ناشی از باکتری‌هایی می‌باشند که آزادانه حرکت می‌کنند (شکل Planktonic) ولی در عفونت‌های مزمن مرتبط با بیوفیلم‌ها، باکتری‌ها با گلیکوکالیکس (Glycocalyx) احاطه شده‌اند (شکل Sessile) و از دسترس سیستم ایمنی مصون می‌باشند [۱۱].

بیوفیلم در زمینه‌های زیست محیطی، صنعتی، و بالینی مهم هستند [۱۴۳]. مؤسسه ملی بهداشت بریتانیا گزارش کرده است که بیش از ۶۰٪ از تمام عفونت‌های میکروبی توسط بیوفیلم ایجاد می‌شود. همچنین هزینه‌ی سالانه درمان عفونت‌های مبتنی بر بیوفیلم بیش از ۱ میلیارد دلار تخمین زده می‌شود [۱۲۱]. عوامل ضد میکروبی به عنوان عوامل شیمیایی و بیولوژیکی کشنده و یا جلوگیری کننده از تکثیر موجودات زنده تعریف می‌شوند. موادی که برای مهار یا کشتن میکروارگانیسم‌ها در بافت زنده استفاده می‌شود، آنتی‌سپتیک (Antiseptic) و مواد شیمیایی که باعث ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌ها در سطوح بی‌جان می‌شوند ضد عفونی کننده (Disinfectant) نامیده می‌شوند. استفاده‌ی گسترده از این محصولات باعث برخی از گمانه‌زنی‌ها در خصوص افزایش مقاومت میکروبی، به ویژه ارتباط این مقاومت آنتی‌بیوتیکی، با ضد عفونی کننده‌های مورد استفاده شده است [۱۲۴].

بیش از نیم قرن است که مواد ضد عفونی کننده در پزشکی و دامپزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند ولی مصرف بیش از اندازه‌ی آن‌ها می‌تواند اثرات زیان‌آوری برای سلامتی داشته باشد، اما در غلظت کمتر برای مهار رشد باکتری‌ها استفاده می‌شوند [۳۴، ۱۱۴].

کلرهگزیدین (Chlorhexidine) و بنزالکونیوم کلراید (Benzalkonium chlorid) یا BAC رشد گونه‌های مختلف باکتریایی را مهار می‌کنند. این دو ماده می‌توانند موجب گسترش بیوفیلم برخی سوش‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (*Staphylococcus epidermidis*) در حداقل غلظت مهاری شوند [۹۵]. در

نتیجه در طول دهه‌ی گذشته افزایش نگران کننده‌ای در محیط‌های بهداشتی به دنبال عفونت توسط میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها و مواد ضدعفونی کننده پدید آمده است. بسیاری از پاتوژن‌های باکتریایی شایع در حیوانات از جمله استرپتوکوکوس آگالاکتیه (*Streptococcus agalactiae*)، استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، پاستورلا مولتی سیدا (*Pasteurella multocida*)، فوزوباکتریوم نکروفوروم (*Fusobacterium necrophorum*)، اشریشیا کلای (*Escherichia coli*)، سالمونلاها (*Salmonella spp*) و سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) نیز به عنوان ایجاد کننده‌ی بیوفیلم مطرح هستند [۵۶،۱۲۸].

هدف مطالعه‌ی حاضر بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف دو ضدعفونی کننده‌ی کلرهگزیدین و بنزالکونیوم کلراید به عنوان نماینده‌ی ضدعفونی کننده‌های موجود، روی بیوفیلم حاصل از جدایه‌های باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس آگالاکتیه به عنوان باکتری‌های گرم مثبت و سالمونلا و اشریشیا کلای به عنوان باکتری‌های گرم منفی جدا شده از موارد عفونت‌های درمانگاهی دامپزشکی می‌باشد.

فصل دوم

کلیات

۲-۱- اهمیت و نقش ضد عفونی کننده‌ها

ضد عفونی کننده‌ها موادی هستند که بتوانند عوامل عفونی یعنی میکرو ارگانیسم‌های بیماری‌زا را از بین ببرند و یا آن که موجب بی اثر کردن آن‌ها گردند. ضد عفونی کردن یعنی عاری کردن از عوامل بیماری‌زا و عمل ضد عفونی، از بین بردن این عوامل و یا بی اثر کردن آن‌ها می‌باشد. باید یاد آور شد که هدف از مدیریت بیماری‌های عفونی باید همیشه جلوگیری از عفونت باشد تا اینکه صرفاً بر پیشگیری و کاهش ضایعات ناشی از بیماری متمرکز شود. درمان پیشگیرانه با داروهای ضد میکروب در بعضی شرایط کاربرد دارد اما استفاده غیر ضروری از داروهای ضد میکروب به منظور پیشگیری از عفونت، استفاده آتی آن‌ها را به علت ایجاد سویه‌های مقاوم با مشکل مواجه می‌سازد [۱۵].

واکسن‌ها با افزایش مقاومت در مقابل بیماری عفونی به پیشگیری از آن کمک می‌نمایند. با این حال واکسن‌ها به ندرت باعث مصونیت مطلق در برابر عفونت می‌شوند و برای تمام بیماری‌های عفونی نیز موجود نیستند. محدودیت اطمینان به داروهای ضد میکروب و واکسن‌ها در کنترل بیماری‌های عفونی، باید به کمک اقداماتی در جهت کنترل تماس با عوامل بیماری‌زا جبران شوند. عوامل عفونی عمدتاً به سه روش تماس فیزیکی یا مستقیم از طریق آلوده شدن غذا و آب، توسط جریان هوا و توسط میزبان آلوده انتشار می‌یابند. بنابراین تلاش‌ها به منظور ایجاد مصونیت در برابر بیماری‌های عفونی باید در جهت جلوگیری از تماس دام‌های حساس با دام‌های آلوده یا اجرام عفونی دفعی از آن‌ها طراحی شوند. ایده‌آل است که این مسئله با جدا سازی و تفکیک اکید یا قرنطینه‌ی دام‌های مبتلا به بیماری‌های واگیر انجام شود. اما جنبه‌های عملی پرورش دام مستلزم آن است که انتشار عفونت با استفاده از مواد شیمیایی که اجرام ریز یا هاگ آن‌ها را در محیط از بین می‌برند، تحت کنترل قرار گیرد. بنابراین نقش ضد عفونی کردن و تأثیر آن در پیشگیری و کنترل عوامل میکروبی و عفونت‌ها قابل تأمل و بررسی خواهد بود [۲،۹].

۲-۱-۱- عوامل مؤثر بر فعالیت ضدعفونی کننده‌ها

این عوامل شامل تمیز بودن جایگاه‌ها قبل از ضد عفونی، ماهیت شیء ضد عفونی شونده، بار مواد آلی موجود، شکل و میزان آلاینده‌ی میکروبی، غلظت و زمان تماس با میکروب کش و شرایط فیزیکی و محیطی مؤثر بر فرآیند عفونت زدایی است.

۲-۱-۱-۱- مواد آلی

مواد آلی نظیر خون، چرک، مدفوع، چربی و بستر همیشه با اثر ضد عفونی کننده تداخل می‌کنند و این تداخل ممکن است از راه‌های متعددی انجام گیرد. تداخل به کرات در اثر واکنش شیمیایی بین ماده‌ی میکروب کش و مواد آلی اتفاق می‌افتد و منجر به ایجاد ترکیبی می‌گردد که به میزان کمتری کشنده‌ی میکروب بوده و یا غیر فعال است، به ویژه ضد عفونی کننده‌های حاوی کلر و ید مستعد چنین تداخل اثری هستند. مواد آلی همچنین قادرند با تشکیل پوشش روی اجرام و ایجاد مانع فیزیکی و جلوگیری از دستیابی راحت مواد ضد عفونی کننده، آن‌ها را محافظت نمایند. بسیاری از محلول‌های ضد عفونی کننده حاوی اجزاء پاک کننده نیز هستند که ممکن است ذرات و مواد کلوئیدی را به حالت تعلیق درآورند و مواد ضد عفونی کننده را جذب نمایند، بنابراین ماده ضد عفونی کننده‌ی محلول از بین می‌رود. بدین جهت، تمیز کردن بسیار دقیق قبل از اجرای هرگونه روش ضد عفونی، بسیار ضروری است. روش‌های ساده مکانیکی از قبیل تمیز کردن، برس زدن، سائیدن با آب پرفشار ممکن است ظاهراً تمام فضولات را از بین ببرند و سطح را برای ضد عفونی آماده نمایند اما یک لایه از مواد آلی باقی می‌ماند و با عمل ضد عفونی تداخل می‌کند. در این موارد ممکن است استفاده از ماده شیمیایی پاک کننده‌ی مخصوص، جهت از بین بردن مواد آلی تجمع یافته ضرورت داشته باشد. بعضی ضد عفونی کننده‌ها مانند تقطیر مشتقات فنل، سبب رسوب پروتئین روی سطوح سخت می‌شوند و بدین وسیله در مؤثر نبودن خود سهیم می‌گردند. بنابراین نقش مواد آلی در میزان قدرت ضد عفونی کنندگی مواد ضد عفونی کننده مشخص می‌شود [۲، ۱۲، ۱۳].

۲-۱-۱-۲- شکل و تعداد اجرام

اجرام نسبت به مواد ضد عفونی کننده مقاومت متفاوتی دارند. پریون‌ها (Perions) و آندوسپوره‌های (Endospore) باکتریایی دارای بیشترین مقاومت نسبت به میکروب کش‌های رایج و عوامل محیطی و فیزیکی هستند. باید دانست که هر چه تعداد میکروب‌های موجود بیشتر باشد، زمان بیشتری برای یک ماده میکروب کش نیاز است تا تمام آن‌ها را از بین ببرد. در هنگام مصرف باید به دستورالعمل ماده‌ی ضد عفونی کننده بر حسب فرآورده اختصاصی از نظر گستردگی فعالیت ضد میکروبی، موارد مصرف و نسبت رقیق کردن دقت نمود [۱۳].

۲-۱-۱-۳- غلظت ماده ضد عفونی کننده

به منظور ایجاد اثر کشندگی مؤثر، یک ماده ضد عفونی کننده باید با غلظت مؤثر و در زمان کافی با اجرام تماس داشته باشد. در ابتدا قبل از آغاز تأثیر ماده ضد عفونی کننده، یک دوره‌ی تاخیری وجود دارد که به دنبال آن تعداد اجرام به صورت لگاریتمی کاهش می‌یابد. بیشتر اجرام طی این دوره از بین می‌روند. در صورتی که دستورات بر حسب ماده ضد عفونی کننده مراعات شوند، معمولاً حداکثر قدرت عفونت زدایی به دست می‌آید. اما دستورات مصرف ممکن است اغلب ناخواسته و بدون توجه به عواقب بعدی آن تغییر داده شوند. به طور کلی غلظت بیشتر یک ماده میکروب کش، کارایی بیشتر آن و مدت زمان کوتاه تری را در

کشتن میکروب‌ها فراهم می‌کند. معمولاً غلظت ماده‌ی ضدعفونی کننده به دلیل احتمال آسیب وارده به سطوح بی‌جان و همچنین قیمت آن از محدودیت برخوردار است. به هر حال بیشتر ضدعفونی کننده‌ها باید به دقت رقیق شوند، در غیر این صورت کارایی آن‌ها کاهش خواهد یافت. این مسئله به ویژه در مورد الکل‌ها و هالوژن‌ها حائز اهمیت است. در صورتی که ماده‌ی ضدعفونی کننده بیش از حد رقیق شود ممکن است اثر آن به حدی کاهش یابد که به جای اثر میکروب کشی تنها موجب توقف رشد آن گردد [۱۲، ۲].

۲-۱-۱-۴- زمان

همان طور که اثر غلظت در بین ضدعفونی کننده‌ها به میزان زیادی متفاوت است، زمان مورد نیاز جهت تماس نیز به طور قابل ملاحظه‌ای اختلاف دارد. ارتباط بین غلظت و زمان تأثیر ماده ضدعفونی کننده به طور ساده عرضه نمی‌شود، بلکه نوعی منحنی لگاریتمی است که بسته به هر ماده ضد عفونی، دامنه‌ی آن متغیر است و به شکل زیر بیان می‌شود.

$$C^n.t = k$$

C = غلظت ماده ضدعفونی کننده

n = ضریبی که برای هر ماده ضدعفونی متفاوت است.

t = زمان لازم برای ضدعفونی کردن است.

ماده‌ای که ارزش n آن زیاد است از حدود یک غلظت مشخص به بالا تأثیر میکروب کشی دارد [۴، ۶].

۲-۱-۱-۵- سایر عوامل

درجه حرارت محیط، تغییرات pH، میزان سختی آب، کشش سطحی و حضور فلزات نیز در قدرت اثر ماده ضدعفونی کننده مؤثر هستند. ارتباطی بین غلظت مؤثر و دوره‌ی تماس ضدعفونی کننده‌ها علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* با یک زمینه‌ی ژنتیکی مشخص در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سلین یا *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)* مشخص شده است. کلرهگزیدین و بتادین (Betadin) پس از ۱/۵ دقیقه سوبه‌های حساس را می‌کشند ولی سوبه‌های با مقاومت کم و زیاد به ترتیب تا ۳ و ۴/۵ دقیقه، غلظت بالاتر از ماده ضدعفونی را تحمل می‌کنند. محققین یک ردیف ژنی مرتبط با ژن *External Beam Radiation (ebr)* را در مورد مقاومت با پوئیدون آیوداین (Povidone Iodine) نشان دادند که مقاومت نسبت به داروهای مؤثر روی DNA و مقاومت نسبت به متی‌سیلین را نیز در بر می‌گیرد. مواد متوقف کننده‌ی کانال‌های کلسیم و مهار کننده‌های کالمودولین (Calmodulin)، مقاومت نسبی به ضدعفونی کننده‌ها را مهار می‌کنند. بقاء ضدعفونی کننده‌ها یا باقیمانده‌ی آن در موضع نیز در تأثیر ماده ضدعفونی نقش دارند. به عنوان مثال الکل به سرعت بخار شده و حذف می‌شود، لیکن کلرهگزیدین مدت‌ها در موضع باقی می‌ماند [۱۲، ۱۳، ۳۲].

۲-۱-۲- خصوصیات یک ماده ضدعفونی کننده‌ی ایده آل

هنگام انتخاب یک ضدعفونی کننده‌ی مناسب و مؤثر باید معیارهای مهمی در نظر گرفته شوند.

مواد ضدعفونی کننده‌ی ایده‌آل باید:

الف) وسیع الطیف و سریع الاثر باشند.

ب) تحت تأثیر عوامل محیطی قرار نگیرد. به طوری که در حضور مواد آلی نظیر خون، خلط و مدفوع باید فعالیت خود را حفظ کند، مصرف آن نباید با استفاده از صابون و سایر مواد شیمیایی مغایرت داشته باشد.

پ) برای مدت طولانی بعد از مصرف، سمیت زیادی بر جای نگذارند و هنگام استنشاق محرک یا سمی نباشند.

ت) برای استفاده سطوح مناسب باشد، نباید روی لوازم و سطوح فلزی خاصیت خوردگی داشته باشد و یا باعث فرسایش مواد پارچه ای، لاستیک، پلاستیک و سایر مواد شود.

ج) پس از مصرف، اثر باقیمانده روی سطوح نداشته باشد.

چ) طریقه‌ی مصرف آن راحت باشد.

ح) فاقد بوی قوی و زننده باشد.

خ) از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشند.

د) در درجه حرارت معمولی هنگام رقیق کردن با آب مؤثر بوده و به راحتی با آب مخلوط شوند.

ذ) در غلظت و رقت مورد مصرف، از تداوم و ثبات برخوردار باشد.

ر) خاصیت پاک کنندگی داشته باشد.

ز) به محیط زیست آسیبی نرساند [۲،۱۳].

۲-۲- انواع مواد ضد عفونی کننده

بسیاری از ضد عفونی کننده‌ها با ترکیباتی مشابه و تحت نام‌های تجاری مختلف در بازار عرضه می‌گردد. این مواد شامل الکل‌ها، آلدئیدها (Aldehyde)، اسیدها و قلیاها، هالوژن‌ها، ترکیبات آمونیم چهارگانه یا Quaternary ammonium compounds (QACs)، کلرگزیدین، مشتقات فنل (Phenolic)، ایمیدازول (Imidazole)، سولفات مس (Cupric sulfate)، روغن کاج (Pine oil) و کروزول (Cresol) می‌باشد. از آنجا که مواد ضد عفونی کننده ای که در این تحقیق به کار برده شد حاوی ترکیباتی از این مواد می‌باشد، لذا در ابتدا توضیحاتی در مورد ترکیبات موجود در ساختمان مواد ضد عفونی کننده، داده می‌شود.

۲-۲-۱- فنل و فنلیک‌ها

فنل ماده‌ی شیمیایی است که از قطران ذغال سنگ تهیه می‌گردد. فنل دارای بوی مخصوص است و پس از حل شدن در آب، رنگ شیری ایجاد می‌کند. فنل‌ها دارای خاصیت میکروب کشی هستند و معمولاً بر روی قارچ‌ها، باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و بعضی از ویروسی‌ها مؤثر هستند ولی تأثیری بر هاگ باکتری‌ها ندارند. رقت‌های فنل خالص امروزه به عنوان آنتی سبتیک استفاده نمی‌شوند زیرا محرک بافتی هستند. در گذشته از فنل خالص برای تعیین ضریب فنلی ضد عفونی کننده‌های دیگر در آزمایشگاه استفاده می‌شد [۱۲]. سازندگان ممکن است ادعا کنند که فنل‌ها در رقت‌های توصیه شده موجب از بین بردن عامل سل، قارچ‌ها، ویروس‌ها، و باکتری‌ها می‌شوند؛ اما روش‌های آزمایش جامعه‌ی رسمی شیمییدان‌های تجزیه‌ای گاهی ادعاهای باکتری کشی را با دلیل و مدرک رد می‌کنند. بنابراین ممکن است واقع‌گرایانه‌تر باشد که هنگام مصرف فنل‌ها در محیط، آن‌ها را به عنوان متوقف کننده‌ی رشد باکتری در نظر بگیرند. برای داشتن اثر ضد میکروبی، محلول‌های فنلی باید در درجه حرارت ۱۵/۵ درجه سانتی گراد (۶۰ درجه فارنهایت) یا بیشتر به کار گرفته شوند. بعضی فنل‌ها از جمله کروزول دارای این مزیت می‌باشد که در حضور مواد آلی بی‌اثر نمی‌شوند [۱۳]. مدت‌ها پس از مصرف در روی سطوح پایدار بوده و باقی می‌ماند. اثر خشک شده‌ی آن در صورتی که مجدداً خیس شود، فعال می‌گردد. بنابراین دارای بسیاری از خصوصیات ماده ضد عفونی خوب است [۲].

ترکیبات فنلی موجب تغییر ماهیت پروتئین‌ها می‌گردند و در ضمن مخصوصاً در غلظت‌های کم سبب پاره شدن پرده یاخته‌ای می‌شوند. اکسیدازها (Oxidase) و دهیدروژنازهای (Dehydrogenase) دیواره‌ی سلولی به وسیله‌ی این ترکیبات به طور غیر قابل برگشتی غیر فعال می‌شوند. فعالیت ضد میکروبی ترکیبات فنل دار به دنبال رقیق شدن کاهش می‌یابد. استحلاف‌های الکیل دار و هالوژنه‌ی فنل و بی‌فنل‌ها معمولاً در مقایسه با فنل، خاصیت ضد میکروبی زیادتر و در ضمن سمیت کمتری داشته و کمتر سوزاننده هستند [۴].

۲-۲-۲- هالوژن‌ها

ید (Iodine) و یدوفورها (Iodophore): ید عامل باکتری کشی وسیع الطیف است. ید عامل اکسید کننده‌ی ضعیفی است و به نظر می‌رسد فعالیت آن مربوط به ترکیب با اسید آمینه‌های پروتئین‌های یاخته‌ای از قبیل تیروزین (Tyrosine) باشد که به طور غیر قابل برگشت ید دار می‌شوند [۴]. یدوفور ترکیبی از ید و یک ماده‌ی حلال یا حامل است و وقتی با آب رقیق شود به آرامی ید خود را آزاد می‌کند. بسیاری از فرآورده‌ها شامل ترکیبی از ید و موادی هستند که کشش سطحی را پائین می‌آورند و خاصیت دترجنت (Detergent) دارند. این مواد خاصیت ضد عفونی ید را افزایش می‌دهند و موجب از بین رفتن رنگ و خواص سمی و سوزانندگی و تحریک کنندگی ید می‌شوند. در واقع یدوفورها موادی هستند که در آن‌ها ید با حامل‌هایی که معمولاً پلیمرهای خنثی هستند تشکیل کمپلکس می‌دهد و این باعث می‌شود تا ید بتواند به شکل قابل تجزیه باقی بماند. مشهورترین و پر مصرف ترین یدوفورها، پویدون آیوداین (Povidone Iodine) است، به علت این‌که جزء فعال یدوفورها ید آزاد است، محلول‌های یدوفور نسبت به محلول‌های بسیار قوی با سرعت بیشتری باکتری‌ها را می‌کشند. برای اینکه ید به عنوان میکروب کش عمل نماید ممکن است به تماس طولانی نیاز داشته باشد. محدودیت اصلی در استفاده از ید، بدین علت است که هاگ کش نیست و فعالیت آن در حالت قلیایی کاهش می‌یابد [۱۲، ۱۳].

Chogawala و Furtado در سال ۱۹۹۰ نشان دادند که تأثیر ۱٪، در از بین بردن 10^7 باکتری *استافیلو کوکوس/رئوس* در روی پوست نسبت به ۱۰٪ سریع تر است [۴۵]. بنابراین تأثیر مواد ضد عفونی کننده و رقت‌های مختلف در از بین بردن این باکتری قابل تأمل است.

کلر: محلول‌های آبی کلر در زمره‌ی پرمصرف‌ترین مواد ضد عفونی کننده و بهداشتی هستند. آب سخت تداخل با اثر آن‌ها ندارد اما مواد آلی، کلر موجود را مصرف می‌کنند. ترکیبات کلردار، ضد عفونی کننده‌های وسیع الطیف مقرون به صرفه با اثر سریع و هاگ کشی قوی هستند که عمدتاً اثر خود را با تغییر دادن ماهیت پروتئین‌ها اعمال می‌کنند. به علت اثر سوزاننده، بی‌اثر شدن توسط مواد آلی و ناپایداری، استفاده از آن‌ها از محدودیت برخوردار است. تجزیه‌ی آن‌ها توسط حرارت، غلظت، نور و مهمتر از همه pH تحت تأثیر قرار می‌گیرد [۱۳].

۲-۲-۳- ترکیبات آمونیوم چهارگانه

از جایگزینی ۴ گروه آلی در مولکول آمونیوم (NH_4) به جای اتم‌های هیدروژن آن ایجاد می‌شود. این ترکیبات محصولاتی بدون بو و شفاف و محلول در آب می‌باشند. سوزانندگی ندارند و باعث خوردگی فلزات نیز نمی‌شوند و دارای خاصیت بو بری و تمیز کنندگی نیز هستند. ترکیب آن الکیل دی متیل بنزین آمونیوم کلراید می‌باشد و ترکیبات آمونیوم چهارگانه - چهارگانه دوتایی - حاوی مخلوطی از نسبت‌های مساوی ترکیب

فوق و الکیل دی متیل بنزین آمونیوم می‌باشد. این ترکیبات دارای اثر قارچ کشی، باکتری کشی و ویروس کشی بر ضد ویروس‌های پوشش دار هستند. قدرت ضد میکروبی این ترکیبات در حضور خون، چرک، سرم و سایر مواد آلی شدیداً کاهش می‌یابد زیرا به دلیل کاتیونی بودن با پروتئین‌ها، چربی‌ها و فسفات‌ها ترکیب می‌شوند. از ترکیبات آمونیوم چهارتایی، ستریمید (Cetrimide) و بنزالکونیوم کلراید را می‌توان نام برد [۱۲،۱۳].

ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی در غلظت بالا وارد یاخته شده و باعث تغییر ماهیت پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود. بار منفی که معمولاً در سطح یاخته وجود دارد، موجب آسان شدن تماس مؤثر بین این مواد و یاخته‌ها می‌گردد. از این موارد برای ضد عفونی پوست، تمیز کردن قبل از جراحی و غیره استفاده می‌شود [۴].

به دلیل این که بخش قابل توجهی از این تحقیق در مورد اثر مهاری بنزالکونیوم کلراید بر باکتری‌ها انجام گرفت، توضیحات بیشتری در این باره ارائه می‌گردد.

۲-۲-۴- بنزالکونیوم کلراید

بنزالکونیوم کلراید (Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride) مخلوطی از الکیل بنزال دی متیل آمونیوم کلراید (Alkylbenzyl dimethylammonium chlorides) است که از زنجیره‌های آلکیل با طول‌های متفاوت ساخته شده است (شکل ۱-۲). این محصول یک عامل کاتیونی نیتروژنی است که روی سطوح عمل می‌کند و وابسته به گروه چهارتایی آمونیوم است. در سه بخش اصلی کاربرد دارد: آفت کش (Biocide)، سورفکتانت‌های کاتیونی (Cationic surfactants) و عامل انتقال فاز در صنایع شیمیایی. به اختصار به آن ADBAC یا BAC می‌گویند.

۲-۲-۴-۱- ویژگی‌ها

معمولاً مصرف بنزالکونیوم کلراید به صورت حل شده در آب، الکل و استون است. اگرچه انحلال آن در آب آهسته است، با این وجود استفاده از حلال‌های آبی راحت تر است و ترجیح داده می‌شوند. محلول‌ها می‌بایست خنثی تا کمی قلیایی و رنگ آن‌ها از بی‌رنگ تا زرد کم رنگ باشند. مزه تلخی دارد و بوی بادام به طور ضعیفی به مشام می‌رسد که فقط در محلول‌های غلیظ این خاصیت متمرکز است.

۲-۲-۴-۱- کاربردها

بنزالکونیوم کلراید کاربردهای بسیار وسیعی دارد از حضور در فرمولولاسیون یک ماده‌ی ضد عفونی کننده، مانند حضور داشتن به عنوان یک عنصر فعال در محصولات تجاری دتول (Dettol) و لیزول (Lysol)، تا مهار خوردگی میکروبی در بخش نفتی و از بین بردن کپک‌های چند سطحی، جلبک و خزه را می‌توان برای آن بر شمرد.

- در داروسازی به عنوان ضد عفونی کننده‌ی پوست
- به عنوان یک ماده‌ی نگهدارنده در محصولات بهداشتی مانند قطره‌ی چشم، بینی و گوش
- به عنوان پاک کننده‌ی دست
- استفاده از آن در دستمال‌های مرطوب و بهداشتی
- به عنوان ضد عفونی کننده‌ی کف و سطوح سخت
- به عنوان محلول‌های ضد عفونی کننده و استریل کننده‌ی بعضی ابزارهای جراحی