

ارزشیابی قدرت قارچ کشی گندزدای بنزالکونیوم کلراید ساخت کشور ایران

دکتر کرامت اله ایماندل^۱ ، دکتر علیرضا مصداقی نیا^۱ ، دکتر حمید شاکری وطن دوست^۱

واژه های کلیدی : ماده گندزدا ، قارچ کش ، درجنت کاتیونی ، بنزالکونیوم کلراید ، ایران

چکیده

اثر ضد قارچی بنزالکونیوم کلراید به کمک روش استاندارد ملی به شماره ۲۸۴۲ موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران روی نمونه های قارچ خالص اسپرژیلوس نی جر کانیدیا آلبیکانس و موکور تولیدی بخش قارچ شناسی دانشکده بهداشت از مهرماه لغایت اسفندماه ۱۳۷۲ مورد بررسی قرار گرفت. تهیه سوسپانسیون های قارچی و شمارش آر با لام نتویار به گونه ای که در هر میلی لیتر آنها به ترتیب $10^7 \times 3/5$ کونیدی اسپرژیلوس نی جر و $10^7 \times 4$ سلول مخمری کانیدیا آلبیکانس و $10^7 \times 2$ اسپور موکور در برداشته باشد و اجرای آزمون شناسائی و تعیین بهترین خشتی کننده برای هر یک از گندزداهای حاوی ترکیبات آمونیوم کواترنر مشتمل بر اخگر ، افشنگ و هامون که به صورت تصادفی از بازار تهیه گردیده بود ، موید آنست که اولاً از بین خشتی کننده های مختلف که به صورت منفرد و دو قلو در این بررسی بکار گرفته شده در مورد سه گندزدای فوق الذکر در برابر کلیه سوش های قارچی مورد آزمون تنها مخلوط لسیتین و توئین بعنوان بهترین خشتی کننده عمل می نماید و بیانگر قدرت یکسان آنها در مقابل خشتی کننده است.

کاربرد رقت های پنج گانه $0/4$ ، $0/6$ ، $0/8$ ، 1 و $1/2$ درصد ماده گندزدا و حضور خشتی کننده و مجاورت هر یک از قارچ ها به تفکیک در pH $6/5$ الی $6/7$ ، موید صحت رقت پیشنهاد شده ، $0/4$ درصد توسط شرکت های سازنده است. به طور کلی نتایج بدست آمده ، از این تحقیق نشان می دهد که بنزالکونیوم کلراید مورد استفاده ، توسط شرکت های سازنده از کیفیت مطلوب برخوردار بوده و با استاندارد ملی کشور ، مطابقت دارد و این قارچ ها در مقابل گندزدای بنزالکونیوم کلراید حساس بوده و هنوز مقاوم نشده اند.

سراغاز

درجنت کاتیونی از عوامل فعال سطحی با ویژگی میکروب کشی بوده که بخش

۱- گروه بهداشت محیط ، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران ، صندوق پستی ۶۴۴۶ - ۱۴۱۵۵ ، تهران ، ایران .

۲- دانشکده داروسازی ، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی ، تهران .

آبدوست آن دارای بار الکتریکی مثبت است و عمدتاً در دسته ترکیبات آمونیوم کواترنر قرار داشته و فرآوردهٔ الکیل هالید با آمین های نوع سوم محسوب می شوند(۱). از دترجنت کاتیونی بنز الکونیوم کلراید می توان منوالکیل تری متیل آمونیوم هالید ، نمک های منوالکیل دی متیل بنزیل آمونیوم هالید ، املاح دی الکیل دی متیل آمونیوم هالید ، نمک های هتروآروماتیک آمونیوم هالید را برشمرد (۲). در مورد اثر آن ها روی میکرواورگانیزم های مختلف ، نظرات گوناگونی ابراز شده است ولی همگی متفق القول هستند که اگر چه بر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی موثر هستند ولی تاثیر زیادتری روی باکتری های گرم مثبت دارند و در دامنه قلیائی اثر بهتری از خود نشان می دهند. آب سخت قادر است قدرت میکروب کشی دترجنت های کاتیونی را تقلیل دهد. امروزه سه نوع پاسخ فیزیولوژیک به خواص سمی ترکیبات آمونیوم کواترنر نسبت داده اند که عبارتند از فعالیت های کوراری (فلج عضلات و گرفتاری های سیستم عصبی مرکزی و یا قلب) ، موسکارینی (تحریک عضلات صاف و انسداد گانگلیونها) ، نیکوتینیک (تحریک اولیه و بطور ثانویه دپرسیون سمپاتیک و پاراسمپاتیک). ولی باید در نظر داشت که LD50 خوراکی نزد موش های سفید برحسب ساختمان شیمیایی بین ۲۳۰ تا ۷۳۰ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن موش گزارش شده است که به ترتیب به لوریل ایزوکوئی نولیتیم بروماید و الکیل دی متیل دی کلروبنزیل آمونیوم کلراید مربوط می گردد (۱).

عده ای از محققین مصرف بنزالکونیوم کلراید را به عنوان ضد عفونی کننده دست تیم جراحی و پوست بیمار قبل از عمل و گندزدائی ابزار و لوازم جراحی و ممانعت از رشد آگها در استخرهای شنای روباز(۲ میلی گرم در لیتر) و باکتری کش ، گندزدائی پارچه و البسه و در فرآورده های آرایشی به عنوان از بین برنده باکتری و اسپور قارچ ها توصیه کرده اند و حتی امروزه تری کاپریلیل متیل آمونیوم کلراید جهت پیشگیری از بیلزدگی پارچه های پشمی معرفی می شود (۱).

نمونه گیری و روش بررسی

این مطالعه از مهرماه لغایت اسفند ماه ۱۳۷۲ در آزمایشگاه بهداشت محیط دانشکده بهداشت در چهار مرحله به مورد اجرا گذاشته شد.

مرحله اول - سوش های خالص قارچی مشتمل بر کاندیدا آلبیکانس ، اسپرژیلوس نی جر و موکور از بخش قارچ شناسی دانشکده بهداشت و سه نمونه گندزدای حاوی بنزالکونیوم - کلراید تحت عنوانی اخگر ، افشنگ و هامون بصورت تصادفی از بازار تهیه گردیده و آنگاه روش استاندارد ملی به شماره ۲۸۴۲ موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران جهت ارزیابی قدرت قارچ کشی مورد استفاده قرار گرفت (۳).

مرحله دوم - ابتدا نمونه های خالص قارچ را روی محیط کشت سابوردکستروزآگارکشت داده

و به کمک گلوله های شیشه ای کوچک ، اسپورها را از سطح محیط جمع آوری کرده و در مورد کاندیدا آلبیکانس به وسیله آنس استریل نمونه از روی سطح محیط برداشته و به محلول رقیق کننده سرم فیزیولوژیک انتقال داده و سوسپانسیون قارچی یکنواخت تهیه گردید. رقیق سازی سوسپانسیون قارچ به کمک سرم فیزیولوژی به گونه ای انجام شد که شمارش سلول های مخمیری و اسپورها در مربع مرکزی (R) لام نشویار در زیر میکروسکوپ (باویژکتیو ۴۰) در هر میلی لیتر از سوسپانسیون به ترتیب کاندیدا آلبیکانس $10^7 \times 4$ ، اسپریلوس $10^7 \times 3/5$ و موکور $10^7 \times 2$ عدد گردد. تأیید صحت شمارش تعداد اسپور در سوسپانسیون قارچی از طریق قرار دادن سوسپانسیون های رقیق شده در بن ماری 21 ± 1 درجه سانتی گراد ، رقیق سازی با سرم فیزیولوژی به نسبت $1/20$ و انجام عمل شمارش و انتقال دو بار ، هربار یک میلی لیتر از سوسپانسیون به بوات دوپتری حاوی سابورو دکستروز آگار مذاب 45 درجه سانتی گراد و قرار دادن آن به مدت $6-2$ روز در حرارت 25 درجه سانتی گراد و شمارش کلنی های ظاهر شده ، به مورد اجرا گذارده شد.

مرحله سوم - در این قسمت از تحقیق ، بهترین خشتی کننده منفرد ، مشتمل بر (زرده تخم مرغ 5%) و خشتی کننده مرکب سه گانه مشتمل بر (زرده تخم مرغ 5% ، توئین 80 3% و لسیتین $3/0\%$) و (اتراکل های چرب پلی گلیکول 3% و لسیتین 2%) که بتواند قدرت گندزدا را 50% زایل نماید ، مورد بررسی قرار گرفت.

خشتی کننده ای مناسب است که برای هریک از سویه ها ، حداقل 50% از اسپورهای قارچی موجود را از اثر کشندگی فرآورده محافظت نماید یعنی $n \geq N/2$ باشد. شرط دیگر مناسب بودن خشتی کننده آن است که غلظت آن در آزمایش اصلی از ده برابر غلظت ماده ضد عفونی کننده بیشتر نباشد. باتوجه به این نکته ، که $0/5$ میلی لیتر از گندزدا را در غلظتی معادل 20 برابر غلظت موثر توصیه شده شرکت سازنده (لوله آزمون) ، و $0/5$ میلی لیتر آب مقطر استریل (لوله شاهد) را جداگانه آماده ساخته ، به هر کدام 9 میلی لیتر از ماده خشتی کننده اضافه کرده و در بن ماری 21 ± 1 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه قرار داده سپس از سوسپانسیون قارچی به هر کدام از دو لوله شاهد و آزمون $0/5$ میلی لیتر اضافه گردید و در بن ماری 21 ± 1 درجه سانتی گراد به بوات دوپتری حاوی محیط کشت سابورو دکستروز آگار منتقل گردید و به مدت $6-2$ روز در حرارت 25 درجه سانتی گراد قرار داده و سپس شمارش کلنی های ظاهر شده در هریک از آنها با رعایت شرط $n \geq N/2$ ، به مورد اجرا گذارده شد. تکرار عملیات مربوط به مرحله دوم برای همان قارچ با جایگزین ساختن گندزداهای افشنگ و هامون تحقق پذیرفت.

مرحله چهارم - ارزشیابی قدرت گندزداهای سه گانه هامون ، افشنگ و اخگر با تهیه رقت مختلف $0/4$ ، $0/6$ و $0/8$ و 1 و $1/2$ درصد با آب مقطر از گندزدا و مجاور ساختن آنان در لوله آزمایش حاوی یک میلی لیتر سوسپانسیون قارچ و 4 میلی لیتر آب مقطر استریل و نگهداری آن به مدت 5 دقیقه در بن ماری 21 ± 1 درجه سانتی گراد به مورد اجرا درآمد در پایان

مدت ذکر شده یک میلی لیتر از مخلوط را برداشته با ۹ میلی لیتر محلول خنثی کننده سترون که در بن ماری 21 ± 1 درجه سانتی گراد قرار دارد وارد ساخته ، پس از ده دقیقه ، یک میلی لیتر از مخلوط را برداشته و تحت شرایط ذکر شده کلنی ها شمارش گردید. این مرحله را برای هر سویه قارچ و هر ماده گنلзда تکرار و نتایج ثبت گردید.

یافته ها و گفتگو

در مطالعاتی که به منظور بررسی قدرت قارچ کشی گنلزدای بنزالکونیوم ساخت کشور طی چهار مرحله از مهرماه لغایت اسفندماه ۱۳۷۲ در آزمایشگاه بهداشت محیط دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران صورت پذیرفت. قدرت گنلزدایی سه نمونه درتجنت کاتیونی حاوی بنزالکونیوم کلراید تحت عناوین اخگر ، افشنگ و هامون در مقابل سه نمونه قارچ خالص اسپرژیلوس نی جر ، کاندیدا آلبیکانس و موکور با حضور خنثی کننده های منفرد و مرکب مورد ارزشیابی قرار گرفت . شترنگه شماره ۱ تعداد سلول های قارچی در میلی لیتر سوسپانسیون رقیق شده با سرم فیزیولوژی و شمارش شده در مربع R لام نئوبار و تعداد کلنی های رشد کرده ناشی از کشت $1/10$ میلی لیتر آن را نشان می دهد.

حداکثر تعداد کلنی های ظاهر شده در محیط کشت ، ۴۲ عدد و به کاندیدا آلبیکانس مربوط می گردد. نتیجه حاصل از اجرای آزمون به منظور تعیین بهترین خنثی کننده در شترنگه شماره ۲ منعکس است و موید آن است که اولاً از بین خنثی کننده های مختلف که بصورت منفرد و مرکب در این بررسی بکار گرفته شد در مورد گنلزدای اخگر ، هامون و افشنگ و در برابر کلیه سوش های قارچی مورد آزمون تنها مخلوط لسیتین و توئین بهترین خنثی کننده عمل می نماید و رابطه $n \geq N/2$ صادق می باشد و به ترتیب در مورد قارچ های اسپرژیلوس نی جر ، کاندیدا آلبیکانس و موکور از راست به چپ $(18 = \frac{21}{2} \geq 21)$ و $(23 \geq \frac{42}{2} = 21/25)$ و $(10 = \frac{20}{2} \geq 12)$ بدست آمد.

ارزشیابی قدرت قارچ کشی گنلزدهای سه گانه با حضور بهترین ماده خنثی کننده در رقت های پنجگانه $0/4$ و $0/6$ و $0/8$ و 1 و $1/2$ در دامنه $\bar{p}H$ $6/5$ الی $6/7$ بیان کننده صحت رقت پیشنهادی $0/4$ درصد توسط شرکت سازنده است به گونه ای که در مورد سوش قارچی کاندیدا آلبیکانس در رقت های یاد شده رشد هیچ کلنی قارچی مشاهده نشده و گرچه در رقت $0/4$ درصد ۳ کلنی قارچی اسپرژیلوس نی جر ظاهر گردید ولی به دلیل برقراری رابطه $10 \leq n \leq 3$ یا $3/4 \leq 3$ لذا این رقت قابل قبول است. ارزشیابی قدرت گنلزدایی افشنگ با رقت $0/4$ درصد پیشنهادی شرکت سازنده و مجاورسازی آن با حضور خنثی کننده لسیتین و توئین با قارچ های کاندیدا آلبیکانس ، اسپرژیلوس نی جر و موکور با عنایت به برقراری رابطه $n \leq N/10$ رقت یاد شده مورد تأیید قرار گرفت و رشد کلنی قارچ همواره در محدوده این رابطه

قرار داشت. اعداد مربوط به آزمایش اصلی در شترنگه شماره ۳ منعکس است. ارزیابی قدرت گندزدایی هامون با رقت ۰/۴ درصد پیشنهادی شرکت سازنده و منجاور سازی آن با حضور خنثی کننده و قارچ های مورد اشاره ، صحت رقت پیشنهادی شرکت سازنده را تأیید می نماید رابطه $n \leq N/10$ همواره برقرار بود. بطور کلی نتایج بدست آمده از این بررسی نشان می دهد که اولاً بنزاکونویوم کلراید تهیه شده توسط شرکت های سازنده از کیفیت مطلوب برخوردار بوده و با استاندارد ملی کشور مطابقت کامل داشته و در برابر سوش های قارچی در همان رقت توصیه شده شرکت سازنده موثر و مفید بوده و در حال حاضر مقاومت دارویی مشاهده نمی شود.

شترنگه ۱- کلنی های ظاهر شده پس از رقیق کردن سوسپانسیون قارچی با رقت 10^{-2} به نسبت ۱/۱۰ توسط محلول رقیق کننده سرم فیزیولوژی و کشت دو پلیت از هر نمونه

نوع قارچ	تعداد اسپورهای موجود در میلی لیتر سوسپانسیون قارچی	تعداد کلنی ها در پتری شماره ۱	تعداد کلنی ها در پتری شماره ۲	معدل تعداد کلنی های شمارش شده
کاندیدا آلبیکانس	۴ ۱۰ ^۷	۴۵	۳۹	۴۲
آسپرژیلوس نی جر	۲/۵ ۱۰ ^۷	۲۶	۳۸	۳۷
موکور	۲ ۱۰ ^۷	۱۹	۲۳	۲۱

شمارش به وسیله لام نتویار و در مربع (R) انجام شده است.

شترنگه ۲- نتایج بدست آمده از آزمایش اولیه تعیین بهترین خشتی کننده

هامون				افشنگ				اشگر				ماده	سوش قارچی
لستین ۸۰ توفین	لستین اترالکال های جرب پلی کلیکول	زرده تخم مرغ تازه ۸۰ توفین	زرده تخم مرغ تازه	لستین ۸۰ توفین	لستین اترالکال های جرب پلی کلیکول	زرده تخم مرغ توفین ۸۰	زرده تخم مرغ تازه	لستین ۸۰ توفین	لستین اترالکال های جرب پلی کلیکول	زرده تخم مرغ تازه ۸۰ توفین	زرده تخم مرغ تازه	خشتی کننده	گندزا
۴۱	۴۱/۵	۲۹/۵	۴۱	۲۰	۴۲	۴۱	۲۴	۲۲/۵	۲۲	۴۰/۵	۴۱	N	کاندیدا
۲۲/۵	۹/۵	۸	۲	۲۲	۹	N/۵	۲	۲۳	۱۸	۱۰	۱	II	آلیکانس
هست	نیست	نیست	نیست	هست	نیست	نیست	نیست	هست	نیست	نیست	نیست	نیست	$II > N/2$
۲۵	۲۷	۲۶	۲۴/۵	۲۵	۲۴	۲۶	۲۵/۵	۲۶	۲۵	۲۷	۲۴	N	اسپوزولوس
۲۱	۱۲/۵	۱۰/۵	۷	۲۱	۷	۵/۵	۳	۲۱	۱۴	۷	۵	II	نی جبر
هست	نیست	نیست	نیست	هست	نیست	نیست	نیست	هست	نیست	نیست	نیست	نیست	$II > N/2$
۲۰/۵	۱۹	۲۱/۵	۲۰	۲۰	۲۱	۱۹	۲۳	۲۰	۲۱/۵	۲۳	۲۱	N	موکور
۱۱/۵	۷/۵	۷	۱	۱۱	N/۵	۵/۵	۴	۱۲	۷	۲	۰	II	
هست	نیست	نیست	نیست	هست	نیست	نیست	نیست	هست	نیست	نیست	نیست	نیست	$II > N/2$

معادل کلنی ها در پلیت های شاهد ، $II =$ معادل کلنی ها در پلیت های آزمون ، $II \geq N/2$ شرط موثر بودن خشتی کننده

شترنگه ۳ - نتایج بدست آمده از آزمایش اصلی تعیین بهترین غلظت موثر ماده گندزدا

گندزدا	سوش فارچی	N/۱۰	معدل تعداد کلنی های ظاهر شده (n) پس از تماس با گندزدا با غلظت های زیر برحسب درصد حجمی				
			۰/۴	۰/۶	۰/۸	۱	۱/۲
اشگر	کاندیدا آلیکانس	۴/۱	۰	۰	۰	۰	۰
	آسپرزیلوس نی جر موکور	۳/۴	۳	۰	۰	۰	۰
		۲/۱	۱	۰	۰	۰	۰
فشنگ	کاندیدا آلیکانس	۴/۱	۳	۰	۰	۰	۰
	آسپرزیلوس نی جر موکور	۳/۴	۱	۰	۰	۰	۰
		۲/۱	۱	۰	۰	۰	۰
هامون	کاندیدا آلیکانس	۴/۱	۰	۰	۰	۰	۰
	آسپرزیلوس نی جر موکور	۳/۴	۲	۰	۰	۰	۰
		۲/۱	۱	۰	۰	۰	۰

n = معدل تعداد کلنی های ظاهر شده از کشت 1ml محلول حاصل از تاثیر ترکیبات گندزدا

N = معدل تعداد کلنی حاصل از کشت 1ml از سوسپانسیون با غلظت 10^2 به نسبت ۱/۱۰

توسط محلول رقیق کننده سرم فیزیولوژی

شرط $n \leq N/10$ ، در رقت ۰/۴ درصد ، برقرار است.

1- Block and Seymour, S. (1983): Disinfection, Sterilization and Preservation , Lee and Febiger Publisher , third edition, USA, P:(476-478).

2- Hugo, W.B., Rusell, A.D. (1989): Pharmaceutical Microbiology, Fourth edition. Black Well Scientific Publication, P.(226-230).

۳- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی (۱۳۶۸): اندازه گیری قدرت میکروب کشی مواد گندزدا، نشریه شماره ۲۸۴۲ ، تهران ، خردادماه ، صفحه (۲۵-۱).