Arak Medical University Journal (AMUJ)
2018; 21(131): 75-85

Original Article

In vitro Inhibitory Effect of Alcoholic and Aqueousextract of Vaccinium Arctostaphylos on ESBLs Producing Klebsiella Strains Isolated from Clinical Specimens in Karaj

Sareh Karimi[1], Azam Haddadi[2*], Parvin Torabzadeh[2]

1. MSc Student, Department of Microbiology, Faculty of Advanced Sciences & Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (IAUPS)
2. Assistant Professor, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Received: 26 Dec 2017, Accepted: 14 Mar 2018

Abstract

Background: In recent years, increasingly antibiotic resistance problem among Klebsiella isolates and side effects of antibiotics overuse have made researchers to study the antimicrobial activity of medicinal plants. The aim of this study was to study the inhibitory effect of ethanolic and aqueous extract of Vaccinium arctostaphylos on ESBLs producing Klebsiella strains.

Materials and Methods: Among 143 isolates of Klebsiella collected from some hospitals and clinical laboratories in Karaj, ESBLs producer were screened by phenotypic confirmatory test (PCT). One of them was identified based on 16S rRNA gene sequencing. MIC and MBC of ethanol and aqueous extracts of Vaccinium arctostaphylos were determined using microdilution method on selected ESBLs producing Klebsiella strains.

Results: Resistance to ceftazidime, ceftriaxon and cefotaxime was observed in 14.7% of the isolates. 32 isolates (22%) were detected as ESBL producers. Results of MIC and MBC tests showed that ethanolic and aqueous extract of Vaccinium arctostaphylos have inhibitory effect on ESBLs producing Klebsiella strains.

Conclusion: The presence of antibacterial activity could be confirmed in most plant species used in traditional medicine in Iran and we should focus on combining traditional medicines and modern drugs.

Keywords: Antibiotic resistance, ESBLs, *Klebsiella*, Vaccinium arctostaphylos

*Corresponding Author:
Address: Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
Email: Haddadi@kiau.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:39 +0430 on Saturday May 19th 2018

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:39 +0430 on Saturday May 19th 2018

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۲۱، شماره ۲ (شماره پیاپی ۱۳۱)، اردیبهشت ۱۳۹۷، ۸۵-۷۵

بررسی تأثیر عصاره‌ی آبی و اتانولی میوه‌ی گیاه قره‌قاط (*Vaccinium arctostaphylos*) برروی ایزوله‌های بالینی کلبسیلا مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در شهر کرج

ساره کریمی[1]، اعظم حدادی[2*]، پروین تراب زاده[2]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فن‌آوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۵، تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر، مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی رو به افزایش در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه و نیز عوارض جانبی ناشی از سوءمصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، محققین را در مطالعه و کشف اثرات ضدمیکروبی گیاهان دارویی مصمم‌تر ساخته است. هدف از این پژوهش، بررسی تاثیر عصاره آبی و اتانولی گیاه قره‌قاط بومی ایران (*Vaccinium arctostaphylos*) علیه ایزوله‌های کلبسیلا مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و مولد عفونت ادراری بود.

مواد و روش‌ها: از بین ۱۴۳ ایزوله کلبسیلا جداسازی شده از نمونه‌های ادراری، باکتری‌های مولد ESBLs با روش دابل دیسک دیفیوژن توسط دیسک‌های ترکیبی مشخص شدند. یکی از ایزوله‌های مولد ESBL، با روش شناسایی مولکولی 16S rRNA، تعیین توالی شد. پس از تهیه میوه‌ی گیاه قره‌قاط و عصاره‌گیری از آن، MIC و MBC عصاره‌های آبی و اتانولی آن با روش میکرودایلوشن برای ایزوله‌های منتخب محاسبه شد.

یافته‌ها: درصد فراوانی مقاومت ایزوله‌ها به سه آنتی بیوتیک سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفتریاکسون، یکسان و برابر با ۱۴/۷ درصد بود. ۳۲ ایزوله (۲۲ درصد) به عنوان نمونه‌های مولد ESBL تعیین شد. نتایج تست‌های MIC و MBC نشان داد که هر دو عصاره آبی و اتانولی اثر مهاری روی ایزوله‌های کلبسیلا مولد ESBLs دارند. بررسی‌های آماری اختلاف کاملاً معناداری را بین MIC و MBC این دو عصاره در بین گروه‌های مورد تحقیق نشان داد.

نتیجه‌گیری: می‌توان وجود فعالیت آنتی‌باکتریال را در اکثر گیاهان دارویی ایران که به صورت سنتی در درمان استفاده می‌شوند تایید کرد و درمان‌های سنتی را در نظام بهداشت و درمان عمومی به شیوه‌ای نوین ادغام نمود.

واژگان کلیدی: کلبسیلا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، قره‌قاط

***نویسنده مسئول:** ایران، کرج، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، گروه میکروبیولوژی

Email: Haddadi@kiau.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:39 +0430 on Saturday May 19th 2018

مقدمه

مجموعه داروهای بتالاکتام (پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، منوباکتام‌ها و کارباپنم‌ها) فراوان‌ترین و پرمصرف‌ترین داروهای تجویزی علیه میکروارگانیسم‌ها هستند. در سال‌های اخیر، پیدایش میکروارگانیسم‌های مقاوم به این داروها نگرانی‌های زیادی را برای پزشکان جهت انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب در فرآیند درمان ایجاد کرده است. یکی از مکانیسم‌های مهم پیدایش مقاومت نسبت به داروهای بتالاکتام، تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) می‌باشد که این آنزیم‌ها با هیدرولیز حلقه بتالاکتام در ساختار داروهای بتالاکتام، مانع از فعالیت ضد میکروبی آن‌ها شده و منجر به ایجاد مقاومت میکروارگانیسم‌ها به داروهای بتالاکتام وسیع‌الطیف می‌شود(۱). بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف آنزیم‌های کد شونده با منشأ پلاسمیدی هستند که توانایی هیدرولیز طیف وسیعی از داروهای بتالاکتام از جمله پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌های نسل یک، دو و سه را دارند. این آنزیم‌ها توسط مهارکننده‌های بتالاکتاماز از جمله کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام مهار می‌شوند (۲). امروزه شیوع پاتوژن‌های مولد ESBLs نگرانی‌های بالینی را افزایش داده است، به طوری‌که عفونت به این ارگانیسم‌ها با میزان مرگ و میر بیشتر، افزایش شیوع بیماری‌ها و افزایش هزینه‌های درمانی مرتبط است. اگرچه ESBLs به طور غالب در گونه‌های اشرشیاکلی وکلبسیلا پنومونیه مشاهده می‌شوند، اما این آنزیم‌ها در سایر جنس‌های خانواده انتروباکتریاسه هم به دست آمده است(۳). در سالیان اخیر به علت بروز مقاومت‌های دارویی و توانایی میکروارگانیسم‌ها در ایجاد عفونت‌های حاد و مزمن و اثرات جانبی کم یا هیچ آن‌ها، استفاده از گیاهان دارویی مورد توجه قرار گرفته است(۴).

از سویی دیگر، سازمان بهداشت جهانی به طور مکرر بر رویکرد جامع به طب سنتی و گیاهان دارویی و نیز ضرورت کاربرد علمی و اقتصادی آن تأکید دارد. این رویکرد یکی از مباحث مهم جهانی در چند دهه اخیر به ویژه در کشورهای در حال توسعه به شمار می‌آید (۴). در نقاط مختلف دنیا استفاده از داروهای سنتی در درمان برخی از بیماری‌ها رایج است. بیشتر داروهای سنتی مواد مشتق شده از گیاهان هستند که به صورت اسانس و عصاره از گیاه استخراج شده و برای درمان استفاده می‌شوند. در هنگام تهیه این داروهای سنتی اصول بهداشتی، مواد مؤثره و دوز مصرف آن مورد توجه قرار نمی‌گیرد. از این‌رو، مطالعاتی که در جهت شناخت مزایا و معایب، شناسایی مواد مؤثره و دوز مصرف داروهای گیاهی انجام می‌شود کمک زیادی به علم پزشکی مدرن خواهد نمود (۴). در این میان گیاهان جنس *Vaccinium* با توجه به خواص ضدمیکروبی آن مورد آزمون‌های متعددی قرار گرفته‌اند. این جنس گونه‌های مختلفی دارد (نزدیک به ۲۰۰ گونه) که یک گونه از آن در ایران وجود دارد. گیاه‌شناسان، قره‌قاط ایران را با نام علمی *Vaccinium arctostaphylos* می‌شناسند که در ارتفاعات استان اردبیل و گیلان، جنگل‌های اسالم به خلخال و کوه‌های تالش، ماسوله و فومن و ارتفاعات کلاردشت در مازندران، لاجیم و رشته کوه هزار مسجد می‌روید(۵). گونه‌های *Vaccinium* غنی از آنتوسیانین‌ها و فلاوونوئیدها هستند.

اکثر گزارشات تأکید دارند که این ترکیبات طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد سرطانی را ارائه می‌دهند (۶). ترکیبات شیمیایی و مواد مؤثره قره‌قاط یا واکسینیوم ایرانی (*V. arctostaphylos L.*) نیز توسط صداقت‌حور و همکاران در سال ۲۰۰۶ بررسی شد (۷).

هدف از این پژوهش بررسی فراوانی ایزوله‌های کلبسیلا مولد ESBLs جدا شده از نمونه‌های ادراری بیماران بستری و سرپایی مراجعه کننده به مراکز درمانی در کرج و بررسی اثر آنتی‌باکتریال عصاره‌های آبی و الکلی میوه گیاه قره‌قاط در شرایط آزمایشگاهی بر روی این ایزوله‌ها می‌باشد.

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:39 +0430 on Saturday May 19th 2018

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

در این تحقیق مشاهده‌ای-توصیفی، در مجموع ۲۰۳ نمونه ادرار از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری مراجعه کننده به بیمارستان‌های البرز، امام خمینی، شهید باهنر، شهید رجایی، کسری و زایشگاه حضرت علی (ع) شهر کرج (از خرداد تا شهریور ۱۳۹۵) و نیز نمونه‌هایی از بانک میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج جمع‌آوری و بر اساس تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند(۸).

ردیابی فنوتیپی تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف

طبق پیشنهادی CLSI به منظور غربال‌گری اولیه ارگانیسم‌های مولد آنزیم ESBL، از آزمون دیسک آگار دیفیوژن استفاده شد. در این روش ابتدا پس از تهیه محیط کشت مولر هینتون آگار(ساخت شرکت میرمدیا)، سوسپانسیون میکروبی مطابق با غلظت استاندارد نیم مک فارلند شرکت بهارافشان تهیه و به طور کامل بر روی محیط مزبور پخش شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تهیه شده از شرکت پادتن طب شامل سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم) را به فاصله حداقل ۲۴ میلی‌متر از یکدیگر بر روی محیط مزبور قرار داده و پس از ۱۶ تا ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۲±۳۵ درجه سیلسیوس، با استفاده از خط‌کش، هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و با استانداردهای جهانی CLSI مقایسه شد(۹). ایزوله‌های مقاوم به نماینده‌های سفالوسپورینی برای تست تاییدی انتخاب شدند. برای این منظور از آزمون Combined Disk استفاده شد. دیسک‌های سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم-کلاولانیک اسید (۱۰ تا ۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) و سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید (۱۰ تا ۳۰ میکروگرم) تهیه شده از شرکت پادتن طب به فاصله حداقل ۲۴ میلی‌متر از یکدیگر بر روی محیط قرار گرفته و پس از ۱۶ تا ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۲±۳۵ درجه سیلسیوس، هاله عدم رشد اطراف دیسک حاوی کلاولانیک اسید به عنوان مهارکننده آنزیم‌های ESBL نسبت به بدون کلاولانیک اسید سنجیده شد. به طوری‌که اگر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های حاوی کلاولانیک اسید بزرگ‌تر یا مساوی ۵ میلی‌متر نسبت به بدون کلاولانیک اسید باشد، سویه مورد نظر را می‌توان بر طبق CLSI به عنوان مولد ESBLs در نظر گرفت (۱۰). تمامی دیسک‌ها قبل از آزمایش با استفاده از سویه استاندارد اشرشیاکلی ATCC 25922 از لحاظ کیفیت کنترل شدند و نتایج با جدول ارائه شده توسط پروتکل CLSI مطابقت داده شد(۹).

شناسایی مولکولی ایزوله‌های منتخب کلبسیلا

به منظور تأیید مولکولی کلبسیلا، یکی از ایزوله‌های مولد ESBLs به طور تصادفی انتخاب و ژن 16S rRNA آن تعیین توالی گردید. بدین منظور، DNA به روش جوشاندن استخراج و جهت انجام واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت(۱۱). توالی پرایمرهای عمومی F9 و R1541 مورد استفاده (ساخت شرکت سیناژن)، جهت شناسایی ژن 16S rRNA (۱۲) و دمای اتصال بهینه شده آن‌ها در جدول ۱ آمده است. مخلوط واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر از 10xPCR reaction buffer، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، ۲۰۰ میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میکرومولار از هر پرایمر، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم تگ پلیمراز (۰/۰۸ واحد بر میکرولیتر) تهیه (ساخت شرکت سیناژن) و ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده به آن اضافه شد. واکنش PCR برای ژن 16S rRNA به صورت واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و سپس در ۳۵ دوره PCR به ترتیب واسرشته سازی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۵ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۴۸ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه و طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت. در نهایت یک مرحله طویل سازی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. محصول PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد توسط

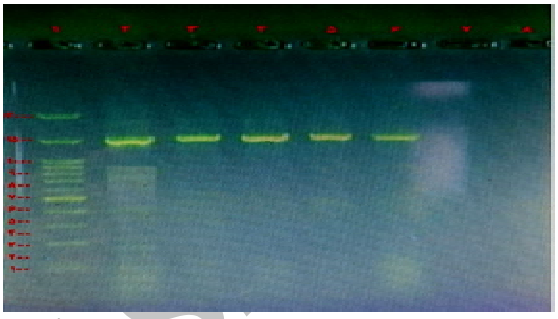
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:39 +0430 on Saturday May 19th 2018

دستگاه ژل داکیومنتیشن مورد بررسی قرار گرفت. ژن تکثیر شده و مشاهده شده بر روی ژل آگارز جهت توالی‌یابی به شرکت Macrogene کره جنوبی ارسال گردید.

جدول۱. ویژگی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن 16S rRNA

ژن	دمای اتصال	توالی (´۵ به ´۳)	نام پرایمر
16S rRNA	٤٨˚C	GAG TTT GAT YMT GGC TCA G	F9
16S rRNA	٤٨˚C	AAG GAG GTG WTC CAR CC	R1541



شکل۱. نتایج انجام PCR و تکثیر ژن 16S rRNA(در این تصویر به ترتیب از سمت چپ مارکر، ایزوله‌های شماره ٢٤، ٢٩K، ٢٩، ٢٣، ٥٩ و نمونه کنترل منفی در چاهک شماره ۸ بررسی شدند.)

تعیین MIC و MBC عصاره‌های آبی و اتانولی قره‌قاط

در این مطالعه، میوه *Vaccinium arctostaphylos* از رویشگاه‌های اطراف شهر اردبیل جمع‌آوری شد. پس از تأیید گیاه، میوه‌ها خشک و پودر گردیدند. سپس عصاره‌گیری از میوه این گیاه با استفاده از اتانول و آب مقطر انجام شد. جهت تهیه عصاره آبی از میوه قره‌قاط، در هر بار عصاره‌گیری مقدار ۱۲۰ گرم پودر میوه در بشر محتوی ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر جوشیده روی هات پلیت قرار داده شد تا مواد مؤثره گیاه خارج شود. جداسازی در چند مرحله با تنظیف استریل، کاغذ صافی معمولی و کاغذ صافی واتمن شماره ۴ صورت گرفت. در این حالت، هر میلی‌لیتر از محلول تهیه شده از عصاره حاوی ۱۲ گرم پودر میوه‌ی گیاه است که به این محلول «عصاره‌ی آبی قره‌قاط» گفته می‌شود. عصاره اتانولی از گیاه قره‌قاط با روش ماسراسیون و تقطیر در خلاء صورت گرفت. ابتدا مقدار ۷۵ گرم پودر میوه گیاه به ۲۰۰ میلی لیتر از حلال اتانول اضافه گردید و به مدت ۷۲ ساعت روی شیکر قرار گرفت. سپس در دستگاه روتاری اواپراتور حجم عصاره به ۲۰ میلی لیتر رسید. در این مرحله در هر میلی‌لیتر عصاره، ۳/۷۵ گرم پودر میوه‌ی گیاه قره‌قاط وجود دارد. محلول حاصل «عصاره‌ی اتانولی قره‌قاط» است(۱۳). به منظور تعیین MIC و MBC عصاره‌ها، از روش میکرودایلوشن استفاده شد. سوسپانسون باکتریایی از کشت تازه پنج ایزوله مولد ESBLs معادل استاندارد نیم مک‌فارلند تهیه گردید. جدول ۲ غلظت عصاره‌ها را در هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته‌گرد استریل نشان می‌دهد.

جدول ۲. غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی میوه قره‌قاط در چاهک‌ها

چاهک	رقت	میزان غلظت عصاره آبی (میلی‌گرم بر میکرولیتر)	میزان غلظت عصاره اتانولی (میلی‌گرم بر میکرولیتر)
۱	۱:۲	۶	۱/۸۷۵
۲	۱:۴	۳	۰/۹۴
۳	۱:۸	۱/۵	۰/۴۷
۴	۱:۱۶	۰/۷۵	۰/۲۳۵
۵	۱:۳۲	۰/۳۷۵	۰/۱۱۷۵
۶	۱:۶۴	۰/۱۸۷۵	۰/۰۵۸۷۵
۷	کنترل مثبت	–	–
۸	کنترل منفی	۶	۱/۸۷۵

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:39 +0430 on Saturday May 19th 2018

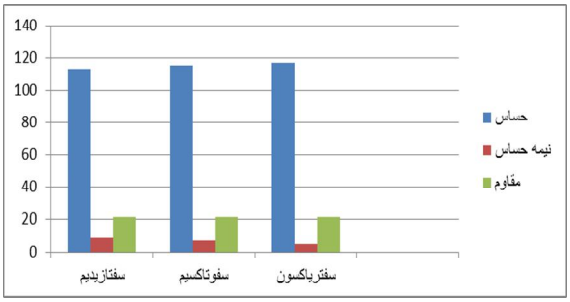
بلافاصله پس از تلقیح سوسپانسیون به چاهک‌ها و مجدداً پس از پایان مدت انکوباسیون، میزان جذب در دستگاه ELISA Reader در طول موج ۶۵۰ نانومتر خوانده شد. از مقایسه میزان جذب نوری قبل و بعد از انکوباسیون در هر یک از چاهک‌ها و نیز بررسی چشمی کدورت ایجاد شده در چاهک ها، کمترین رقت از غلظت عصاره‌ها که در چاهک مربوط به آن غلظت کدورتی مشاهده نمی‌شد، به عنوان MIC در نظر گرفته شد. جهت اطمینان از نتایج، تمام آزمایشات برای هر سوش سه بار تکرار گردید. برای تعیین MBC چاهک‌هایی که رشد باکتری در آن‌ها متوقف شده‌است و دو چاهک ماقبل در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت خطی انجام و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. سپس با بررسی پلیت‌ها، پایین‌ترین غلظتی که در آن ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها رشد نداشتند، به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۱۴).

تحلیل آماری

به منظور تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (آنووا)، سپس به منظور بررسی دقیق‌تر و رتبه‌بندی گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی و شفه استفاده شد.

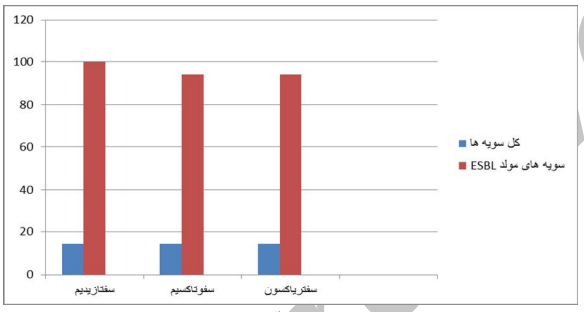
یافته‌ها

از مجموع ۲۰۳ نمونه بالینی، تعداد ۱۴۳ نمونه کلبسیلا با انجام آزمایشات بیوشیمیایی تأیید شدند. نتایج حاصل از تعیین توالی ژن حفاظت شده 16S rRNA ایزوله منتخب مولد ESBL مبین تطابق ۹۷ درصدی با ژنوم باکتری کلبسیلا پنومونیه در بانک ژنی بود. طبق نتایج به دست آمده، درصد فراوانی ایزوله‌های مقاوم به هر سه آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفتریاکسون، یکسان و ۱۴/۷ درصد بود، درحالی‌که بیشترین حساسیت به آنتی بیوتیک سفتریاکسون (۸۲/۳ درصد) و کمترین حساسیت به آنتی بیوتیک سفتازیدیم (۷۹/۵ درصد) گزارش شد(نمودار ۱).



نمودار ۱. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های کلبسیلا مورد مطالعه

از تعداد ۱۴۳ نمونه کلبسیلا، تعداد ۳۲ ایزوله مولد ESBL (۲۲ درصد) و تعداد ۱۱۱ ایزوله فاقد ESBL (۷۸ درصد) بودند. درصد مقاومت ایزوله‌های مولد ESBL نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفتریاکسون به ترتیب ۱۰۰، ۹۴ و ۹۴ درصد بود. نمودار ۲ مقایسه‌ای بین درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورینی مورد مطالعه در بین ایزوله‌های مولد ESBL و تمامی ایزوله‌های کلبسیلا را نشان می‌دهد.



نمودار ۲. مقایسه درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورینی بین ایزوله‌های مولد ESBL و تمامی ایزوله‌های کلبسیلا

MIC عصاره‌ی آبی در مورد هر ۵ ایزوله منتخب کلبسیلا مولد ESBL، ۶ میلی‌گرم بر میکرولیتر گزارش گردید. در حالی‌که MIC عصاره اتانولی در مورد ۴ ایزوله از ۵ ایزوله منتخب ۰/۹۴ میلی‌گرم بر میکرولیتر و در مورد ایزوله پنجم، ۱/۸۷۵ میلی‌گرم بر میکرولیتر گزارش شد. MIC و MBC عصاره‌ی آبی و اتانولی در مورد ۵ ایزوله منتخب در جدول ۳ آمده است.

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:39 +0430 on Saturday May 19th 2018

جدول ۳. MIC و MBC عصاره‌ی آبی و الکلی قره‌قاط در نمونه‌های+ESBL

شماره ایزوله‌های کلبسیلا مولد ESBL	عصاره‌ی آبی (میلی‌گرم بر میکرولیتر)		عصاره‌ی اتانولی (میلی‌گرم بر میکرولیتر)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
۲۴	۶	۶	۰/۹۴	-
۲۹K	۶	۶	۰/۹۴	۱/۸۷۵
۲۹	۶	۶	۰/۹۴	۱/۸۷۵
۲۳	۶	۶	۰/۹۴	۱/۸۷۵
۵۹	۶	۶	۱/۸۷۵	۱/۸۷۵

آزمون تحلیل واریانس یک طرفه، اختلاف بین غلظت‌های عصاره‌ی آبی و نیز اتانولی میوه‌ی گیاه قره‌قاط را برای ایزوله‌های کلبسیلا مولد ESBL مورد بررسی، معنی‌دار نشان داد($p<۰/۰۵$).

به منظور بررسی دقیق‌تر و رتبه‌بندی گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی و شفه استفاده شد. نتایج نشان داد که میزان اثر عصاره‌ی آبی برای همه ایزوله های مورد بررسی یکسان و در مورد عصاره‌ی الکلی برای چهار ایزوله حداکثر اثر تأیید گردید.

بحث

سویه‌های کلبسیلا پنومونیه اغلب پاتوژن‌های فرصت طلب دخیل در عفونت‌های دستگاه ادراری و عفونت‌های مرتبط با سوند دستگاه ادراری بیماران بستری و افراد در معرض خطر هستند. عفونت‌های دستگاه ادراری (UTI) یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در سن‌های متفاوت است. مهم‌ترین عامل عفونت مجرای ادراری در دنیا اشرشیاکلی و متعاقب آن کلبسیلا پنومونیه است. کلبسیلا پنومونیه در ۱۶ تا ۱۷ درصد از عفونت‌های ادراری بیمارستانی نقش دارد. سفالوسپورین‌ها، فلوروکوینولون‌ها، آمینوگلیکوزیدها و کارباپنم‌ها داروهای مؤثر در درمان عفونت‌های ناشی از کلبسیلا هستند. به دلیل استفاده وسیع و نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها طی دو دهه اخیر، باکتری‌ها مقاوم به درمان شده و افزایش آمار مرگ و میر ناشی از آن‌ها مورد توجه قرار گرفته است. مهم‌ترین مکانیسم مقاومت بر علیه عوامل ضدمیکروبی در باکتری‌های گرم منفی مهم هیدرولیز آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام توسط آنزیم‌های بتالاکتاماز است. در این تحقیق سعی شد گام‌هایی در جهت اثبات اثرات ضد میکروبی گیاه ایرانی موسوم به قره‌قاط *Vaccinium arctostaphylos* بر روی ایزوله های کلبسیلا مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف برداشته شود. هدف اصلی مطالعه حاضر جمع‌آوری و جداسازی سویه‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از نمونه‌های ادراری مراجعین به بیمارستان‌ها و مراکز درمانی در سطح کرج و بررسی اثر مهاری عصاره‌ی میوه گیاه قره‌قاط (*Vaccinium arctostaphylos*) بر رشد باکتری کلبسیلای منتخب می‌باشد. با توجه به فراوانی و انتشار سویه‌های مقاوم به درمان این باکتری، نیاز به درمان‌های جانبی با عوارض ناخواسته کمتر که شانس ایجاد مقاومت درمانی را کمتر می‌کند، امری ضروری و حیاتی می‌نماید. اگر چه جمع‌آوری نمونه‌های بالینی ادرار خالی از اشکال و سختی نیست، ولی سعی شد با آموزش‌های اولیه به بیماران در مورد نحوه استاندارد نمونه‌گیری، این مشکل تا حدودی مرتفع گردد. از طرفی، شیوع عفونت کلبسیلایی در مقایسه با عفونت اشرشیایی کم‌تر و در نتیجه گردآوری تعداد قابل بررسی زمان‌بر می‌باشد. از بین ۱۴۳ ایزوله کلبسیلا جداسازی شده از نمونه‌های ادراری، ۳۲ سویه مولد ESBLs بودند (۲۲ درصد). درصد فراوانی مقاومت سویه‌ها به هر سه آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در این مطالعه یکسان و معادل۱۴/۷ گزارش گردید. MIC عصاره‌ی آبی قره‌قاط برای هر ۵ سوش مورد مطالعه، ۶ میلی‌گرم بر میکرولیتر و MIC عصاره اتانولی آن در مورد ۴ ایزوله از ۵

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:39 +0430 on Saturday May 19th 2018

ایزوله منتخب ۰/۹۴ میلی‌گرم بر میکرولیتر و در مورد ایزوله پنجم، ۱/۸۷۵ میلی‌گرم بر میکرولیتر گزارش شد. در تفسیر MIC و MBC عصاره آبی و اتانولی میوه گیاه مذکور می‌توان دریافت، عصاره آبی قره‌قاط تنها در غلظت‌های بالای عصاره قادر به مهار رشد ایزوله‌های باکتریایی مورد سنجش بود، به گونه‌ای که حداقل غلظت مهارکننده عصاره‌ی آبی با حداقل غلظت کشندگی آن یکسان و برابر غلظت ۶ میلی‌گرم بر میکرولیتر است. در کل، عصاره‌ی آبی قره‌قاط دارای اثر ضدباکتریایی است، زیرا در غلظت‌های بالا ممانعت رشد باکتری مذکور گزارش شد. در مورد عصاره اتانولی همان‌گونه که انتظار می‌رفت، قدرت مهارکنندگی رشد نسبت به عصاره‌ی آبی بیشتر بود و هم‌چنین این پژوهش مشخص کردکه در قیاس با عصاره‌ی آبی، این عصاره در غلظت‌های پایین‌تر قادر به مهار رشد ایزوله‌های کلبسیلا می باشد، به گونه‌ای که حداقل غلظت مهارکنندگی رشد برابر با ۰/۹۴ میلی‌گرم بر میکرولیتر و حداقل غلظت کشندگی ۱/۸۷۵ میلی‌گرم بر میکرولیتر بود. از آن‌جا که حلال آب توانایی کمی در انحلال یا استخراج مواد مؤثره گیاه دارد و نیز عمل جوشاندن پودر گیاه در آب جهت عصاره‌گیری سبب تخریب مواد مؤثره‌ی گیاه می‌گردد و این در حالی است که عمل جوشاندن در مورد سایر حلال‌ها انجام نمی‌شود و هم‌چنین استخراج ماده مؤثره گیاهی توسط حلال‌های مختلف منجر به استخراج مواد مؤثره متفاوتی از گیاه می‌گردد و از طرفی حلال‌های متفاوت مورد استفاده در استخراج ماده مؤثره و نحوه عصاره‌گیری، حتی در صورت استخراج مواد مؤثره یکسان، ممکن است از نظر میزان انحلال و یا سایر خصوصیات شیمیایی از جمله خواص ضدمیکروبی متفاوت باشند، از این رو این دلایل می توانند توجیه تفاوت میزان اثر دو عصاره آبی و اتانولی قره‌قاط باشند.

غفوریان و همکاران (۲۰۱۱) میزان شیوع ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBLs جدا شده از عفونت‌های دستگاه تنفسی در بیمارستان‌های ۳ شهر ایران را ۵۹/۲ درصد اعلام نمود(۱۵). اگرچه منبع نمونه‌های مولد ESBLs بررسی شده در این پژوهش (دستگاه تنفسی) با پژوهش حاضر (دستگاه ادراری) متفاوت است، ممکن است تفاوت نتایج این دو پژوهش مربوط به تفاوت جمعیت شهری و یا روش‌های مورد مطالعه باشد. اکبری و همکاران (۱۳۹۳) از بین ۴۰۰ پاتوژن جدا شده از نمونه‌های ادراری از بیمارستان امام خمینی اردبیل با استفاده از آزمون تأییدی دیسک ترکیبی برای تولید ESBLs، ۳۶/۷۵ درصد را مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف گزارش نمودند و به طور خاص میزان شیوع برای گونه کلبسیلا پنومونیه ۱۰/۲ درصد تعیین گردید که نسبت به این پژوهش کمترمی باشد(۲۲ درصد) که می تواند نشانه افزایش ایزوله های مولد این آنزیم باشد(۱۶). عسگری و همکاران (۱۳۹۴) طی پژوهشی به منظور بررسی شیوع ژن های blaTEM و blaSHV در ایزوله‌های کلبسیلا مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف در شهر کرج، ۲۵ درصد از ایزوله‌ها را به عنوان نمونه‌های مولد ESBLs گزارش کردند که از این تعداد ۹۲ درصد کلبسیلا پنومونیه و ۸ درصد کلبسیلا اکسی توکا بودند که به نتایج این پژوهش بسیار نزدیک می باشد (۲۲ درصد). این دو پژوهش که مربوط به شهر کرج هستند میزان مقاومت ایزوله‌های مولد ESBL نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفتریاکسون را به ترتیب ۹۶، ۹۶ و ۸۸ درصد اعلام کردندکه در پژوهش حاضر این میزان مقاومت به ترتیب ۱۰۰، ۹۴ و ۹۴ درصد بود که بسیار به هم نزدیک است(۱۷). شاهنده و همکاران (۲۰۱۶) طی مطالعه خود ۶۴/۴ درصد از گونه‌های کلبسیلا را مولد حداقل یک نوع از بتالاکتامازها گزارش نمودند و شیوع گونه‌های کلبسیلا مولد ESBLs را ۴۲/۴ درصد بیان کردند(۱۸). تحقیقات زیادی بر روی خواص دارویی و به ویژه خصوصیات ضدمیکروبی گونه‌های شاخص قره‌قاط و نیز تنها گونه ایرانی آن یعنی *Vaccinium arctostaphylos* انجام شده است که پژوهش حاضر نتایج برخی را تأیید کرده و مکمل برخی دیگر است. دالگر و همکاران (۲۰۰۴) نشان

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:39 +0430 on Saturday May 19th 2018

دادند که کلبسیلا پنومونیه به عصاره‌ی اتانولی *Vaccinium arctostaphylos* حساس است(۱۹). در تحقیق حاضر حساسیت باکتری‌های مقاوم مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف از جنس مذکور به عصاره‌ی اتانولی میوه گیاه *Vaccinium arctostaphylos* در غلظت‌های ۰/۹۴ و ۱/۸۷۵ میلی‌گرم بر میکرولیتر تأیید شد. رهبر و همکاران (۲۰۱۰) فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ی متانولی *Vaccinium macrocarpon* (Cranberry) را بر *اشرشیا کلی*، *E. aerogenese*، K. *pneumonia* و *S. aureus* نشان دادند(۲۰). در پژوهش حاضر فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و اتانولی *Vaccinium arctostaphylus* بروی ایزوله‌های کلبسیلا مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف نشان داده شد. طاهرپور (۲۰۱۱) طی گزارشی بیان نمود که گیاه فوق یک گیاه دارویی مفید است و در علم پزشکی نیز از اهمیت فراوانی برای درمان بیماری‌های قلبی، بیماری‌های دهان، عفونت ادراری، سنگ کلیه، سرطان و بیماری‌های گوارشی برخوردار می‌باشد. وی اثر سینرژیسم عصاره‌ی آبی *Vaccinium arctostaphylos* را به همراه آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، آمپی‌سیلین و نیتروفورانتوئین در درمان عفونت‌های ادراری با منشأ اشرشیاکلی به صورت درون تنی بررسی کرد. نتایج نشان داد که مصرف قره‌قاط با آنتی‌بیوتیک‌های مذکور می‌تواند کاهش اثرات تداخلی (اثر آنتاگونیستی) و در نهایت کاهش اثرات دارویی آنتی‌بیوتیک را در درمان عفونت‌های ادراری در پی داشته باشد(۲۱). با وجود این‌که در پژوهش حاضر مشخص شد عصاره‌ی آبی و الکلی میوه گیاه قره‌قاط اثر ضدمیکروبی علیه کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL دارد، مطالعه در مورد تداخل اثر درمانی آنتی بیوتیک‌ها با عصاره گیاهانی از جمله قره‌قاط برای استفاده از آن‌ها در درمان عفونت‌های ادراری ضروری است.

محبوبی و همکاران (۲۰۱۳) طی یک تحقیق فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و اتیل استات برگ و میوه *Vaccinium arctostaphylos* و ارتباط آن‌ها با فعالیت آنتی‌اکسیدانتی گیاه را بررسی کردند. آن‌ها نتیجه گرفتند عصاره‌های مختلف برگ فعالیت ضد میکروبی بهتری نسبت به عصاره‌های میوه دارند. عصاره اتانولی برگ *Vaccinium arctostaphylos* فعالیت ضد میکروبی وسیعی علیه کلبسیلا پنومونیه (باحداقل غلظت مهارکنندگی برابر ۶/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نشان داد(۲۲). در مطالعه محبوبی و همکاران، MIC برای عصاره‌ی آبی میوه ی قره قاط علیه کلبسیلا پنومونیه برابر ۲۵/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای عصاره اتانولی آن معادل ۱۲/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است، در حالی‌که در پژوهش حاضر علیه کلبسیلاهای مقاوم مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف به ترتیب ۶ و ۰/۹۴ میلی‌گرم بر میکرولیتر گزارش گردید. در هر دو مطالعه حساسیت بیشتر به عصاره‌ی اتانولی مشخص است. تیموری (۲۰۱۴) در پژوهشی نشان داد اسانس روغنی *Vaccinium arctostaphylos* بر باکتری‌های مورد مطالعه شامل *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumoniae*، *Enterococcus faecalis* و *Streptococcus pneumonia* بر خلاف *Staphylococcus aureus* فعالیت ضدباکتریایی دارد. برخلاف اسانس روغنی، عصاره هیدروالکلی از بخش‌های هوایی گل دهنده *Vaccinium arctostaphylos* خشک شده اثرات ضدباکتریایی علیه میکروارگانیسم‌های یاد شده نشان نداد. هم‌چنین در مورد سوش استاندارد کلبسیلا پنومونیه، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی برای اسانس روغنی حاصل از قره‌قاط به ترتیب ۰/۴۴ و ۰/۷۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش گردید(۲۳). معینی و همکاران (۱۳۹۴) نشان دادند که عصاره متانولی و آبی تهیه شده از میوه گیاه *Vaccinium arctostaphylos* اثر مهارکنندگی بر روی رشد باکتری سالمونلا دارد. یافته‌های تحقیق آن‌ها نشان داد که عصاره‌های گیاه مذکور با حداقل غلظت مهارکننده در محدوده ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تأثیر بازدارندگی

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:39 +0430 on Saturday May 19th 2018

مناسبی بر گونه‌های استاندارد و شش نمونه بالینی سالمونلا دارد. هم‌چنین نتایج نشان داد که ترکیبات فعال موجود در عصاره‌ی آبی از رشد گونه‌های سالمونلا جلوگیری می‌کند، لیکن توانایی حذف آن‌ها را ندارند. هم‌چنین، اثر مهاری عصاره‌های متانولی *Vaccinium arctostaphylos* بیشتر از عصاره‌های آبی تهیه شده با روش عصاره‌گیری یکسان بود(۱۴). این موضوع در پژوهش حاضر نیز به وضوح تأیید گردید. احتمالاً برخی از تفاوت‌ها در نتایج این پژوهش در مقایسه با دیگر تحقیقات ممکن است به علت تنوع در نوع گیاه، روش عصاره‌گیری، نوع حلال یا سویه باکتریایی مورد مطالعه باشد. لیکن نتایج به دست آمده در این پژوهش با تحقیقات سایر محققان همسو بوده و فعالیت ضدمیکروبی *Vaccinium arctostaphylos* را تأیید می‌کند.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، تأثیر خواص ضدمیکروبی عصاره‌ی آبی و اتانولی میوه‌ی گیاه قره‌قاط بر سویه‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف در نمونه‌های به دست آمده از کلبسیلاهای مولد عفونت مجاری ادراری بررسی و تأیید گردید، عصاره‌های گیاه مذکور قادرند در مقادیر بالایی از MIC با ممانعت از رشد و تکثیر باکتری کلبسیلا در کنترل عفونت‌های مجاری ادراری- تناسلی نقش موثری داشته باشند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مساعدت‌های کارکنان بخش میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج در انجام این پژوهش قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Muller S, Oesterlein A, Frosch M, Abele-Horn M, Valenza G. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases and qnr plasmid-mediated quinolone resistance in german isolates of Enterobacter spp. Microb Drug Resist. 2011; 17(1): 99-103.
2. Fernandez A, Jose Pereira M, Manuel Sua rez J, Poza M, Trevino M, Villalon P, Antonio Saez-Nieto J et al. Emergence in Spain of a multidrug-resistant Enterobacter cloacae clinical isolate producing SFO-1 extended-spectrum beta-lactamases. J Clin Microbial. 2011; 49(3): 822-8.
3. Torshizi R, Zamanzad B, Mokhtareyan K, Karimi A. Determination of CTX-M genes in enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase using PCR method. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences (J Shahrekord Univ Med Sci) 2011; 13(3): 9-17. (Persian)
4. Arjmand Shabestary A, Khaloei M, Arjomandzadegan M, Eslamirad Z, Ghasemikhah R. Effect of Zataria, Mentha pulegium, Oregano spp essential oil and hydroalcholic extract of Hypericum perforatum on cyst of Acanthamoeba spp. Arak Medical University Journal. 2017; 20(125): 1-8.
5. Emad M. Vaccinium arctostaphylos.1st ed. Iran: pooneh publishers; 2012.
6. Zushang Su. Anthocyanins and Flavonoids of Vaccinium L. Pharmaceutical Crops USA. 2012; 3: 7-37.
7. Sedaghathoor Sh, Kashi A, Talae AR, Khalighi A. Essential oils of Qare-Qat (Vaccinium arctostaphylos) shoots and chemical composition of berrie. Int.J.Agr.Biol. 2006; 1: 45-6.
8. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Baily & Scott's diagostic microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby Elsevier; 2007. 525-32.
9. Wayne, PA. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performans Standards for Antimicrobial Susceptibilit Testing:Informational Supplement M100-S18. Philadelphia; 2008.
10. Wayne, PA. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing, 20th informational supplement. Philadelphia ; 2010.
11. Hammond DS, Schooneveldt JM, Nimmo GR, Huygens F, Giffard PM. blaSHV genes in Klebsiella pneumoniae: different allele distributions are associated with different

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:39 +0430 on Saturday May 19th 2018

promoters within individual isolates. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 256-63.
12. Abdi M, Hamedi J, Haghighat S. Isolation and Molecular Identification of Antifungal Producing Rare-actinobacteria against Candida albicans. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine 2017; 76(22): 15-22. (Persian).
13. Haghighat M. Evaluation of aqueous extract of Vaccinium arctostaphylos on the blood glucose level in mice Balb/C (Dissertation). Islamic Azad University; 2014.(Persian)
14. Moini F, Mohammadi Sichani M, Shahanipoor K. Evaluation of the antibacterial effect of methanol and aqueous extracts of Vaccinium arctostaphylos Fruit against Salmonella spp in vitro. J Rafsanjan Univ Med Sci 2015; 14(4): 257-68. (Persian)
15. Ghafourian S et al. The prevalence of ESBLs producing Klebsiella pneumonia some major hospitals, Iran. The Open Microbiology Journal, 2011; 5: 91-95.
16. Akbari M, Amir Mozaffari N, Peeri Dogaheh H. Prevalence of extended-spectrum beta lactamase in Entrobacteriaceae isolated from urinary tract infections in Ardabil, Iran. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 2014; 14(3): 285-291 (Full Text in Persian).
17.Asgari Sh, Haddadi A, Harzandi N. Frequency of TEM and SHV in the extended-spectrum beta-lactamase producing Klebsiella isolates from Karaj city. Medical Science Journal of Islamic Azad University 2015; 25(4): 277-282.
18.Shahandeh Z, Sadighian F, Rekabpor Kh. Phenotypic detection of ESBL, MBL (IMP-1), and AmpC enzymes, and their coexistence in Enterobacter and Klebsiella species isolated from clinical specimens. Int Enteric Pathog. 2016; 4(2): 1-7.
19.Dulger B, Gonuz A. Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. Asia Journal of Plant Sciences. 2004; 3(1): 104-107.
20.Rahbar M, Diba K. In vitro activity of cranberry extract against etiological agents of urinary tract infections. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2010; 4(5): 286-288.
21.Taherpour A. Effect investigation of aqueous cranberry (Vaccinium arctostaphylos L.) extract in accompanied with antibiotics on urinary tract infections (UTI) created by Escherichiacoli in vitro. J Clin Manag Compel UTI.2011; 65: 265-80.
22.Mahboubi M, Kazempour N, Taghizadeh M. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of Vaccinium arctostaphylos L. extracts. TBAP. 2013; 3(4): 241-247.
23.Teimouri M. The chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of Vaccinium arctostaphylos L. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research. 2014; 2(11): 2837-284.

Archive of SID

www.SID.ir