Avicenna Journal of Clinical Medicine No 86, Volume 24, Issue 4, Winter 2018, Pages: 336-344

Original Article

doi: 10.21859/ajcm.24.4.336

Comparison of the Effects of *Hypericum perforatum* extract and its Microemulsion with *Aloe vera* Extract on *Brucella melitensis*

Mahsa Tabibnejad[1], Mohammad Arjomandzadegan[2], Mohammad Yousef Alikhani[3], Maryam Sadrnia[4,*], Ghasem Habibi[5], Zahra Naseri[6]

[1] *MSc in Microbiology, Infectious Diseases Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran*
[2] *Associate Professor of Microbiology, Infectious Diseases Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran*
[3] *Professor of Microbiology, Brucellosis Research Center, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran*
[4] *Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Iran*
[5] *Medical Student, Infectious Diseases Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran*
[6] *MSc in Microbiology, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion, Hamadan, Iran*

***Corresponding Author:** Maryam Sadrnia, Department of Biology, Payame Noor University, Iran. Email: msadrnia@yahoo.com*

Received: 19.08.2017
Accepted: 15.01.2018

How to Cite this Article:
Tabibnejad M, Arjomandzadegan M, Alikhani MY, Sadrnia M, Habibi G, Naseri Z. Comparison of the Effects of *Hypericum perforatum* extract and its Microemulsion with *Aloe vera* Extract on *Brucella melitensis*. *Avicenna J Clin Med*. 2018; 24(4): 336-344. DOI: 10.21859/ajcm. 24.4.336.

Abstract

Background and Objective: Today, due to the occurrence of drug resistance and the ability of bacteria to develop acute infections, investigating the antimicrobial effects of herbs has been proposed**.** Therefore, we aimed to examine the effects of *Hypericum perforatum* extract and microemulsion and *Aloe vera* extract on *Brucella* bacteria.

Materials and Methods: This experimental study was carried out with the help of a hood in a biosafety level 2 laboratory. Fifty blood serum samples were cultured in BACTEC for brucellosis, and if grown, they were transferred to *Brucella* Agar in an anaerojar containing 10-5% CO_2 for 48-72 h. Biochemical validation tests were carried out on the grown samples. Extraction was performed by a reflux (distillation) apparatus in a 1 liter balloon and a 40 cm spiral arm. Microemulsion structure was prepared by emulsifiers from the extract. Afterwards, 1, 8.4, and 2 mg/L dilutions of the aqueous extracts of *Hypericum perforatum* and *Aloe vera* were prepared, and the antimicrobial properties of these extracts were evaluated by disc diffusion, pour plate, and extraction methods on pure culture of *Brucella* isolated from patients.

Results: Evaluation of antimicrobial effects on the isolated *Brucella* strains showed that the mean diameters of the zones of inhibition in the studied strains for the of 8-1 mg/l concentrations of *Hypericum perforatum* extract were 36.6±2 and 18±3 mm, respectively, and for *Aloe vera* they were respectively 30.7±3 and 18±1 mm. None of the strains formed an inhibition zone at the 0.5 mg/l concentration. Evaluation of the effect of the extract in the well diffusion method also yielded similar results, but in the pour plate method, the effect of the extractes on the bacteria was not observed. Micoemulsion of the *Hypericum perforatum* extract did not have any effect because of over dilution.

Conclusion: The disk diffusion method under biosafety level 2 laboratory was highly effective, and the extract of *Hypericum perforatum* had the highest effect on *Brucella*; therefore, it is recommended for clinical studies.

Keywords: *Aloe vera*, *Brucella*, Brucellosis, *Hypericum perforatum*, Microemulsion

Archive of SID

Copyright © 2018 Avicenna Journal of Clinical Medicine

www.SID.ir

مجله پزشکی بالینی ابن سینا | دوره ۲۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۶، صفحات ۳۳۶ تا ۳۴۴

مقاله پژوهشی

doi: 10.21859/ajcm.24.4.336

مقایسه اثر عصاره گل راعی و میکرواملسیون آن با عصاره آلوئه ورا بر باکتری *بروسلا*

مهسا طبیب‌نژاد[۱]، محمد ارجمندزادگان[۲]، محمد یوسف علیخانی[۳]، مریم صدرنیا[۴،*]، قاسم حبیبی[۵]، زهرا ناصری[۶]

[۱] کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

[۲] دانشیار میکروب‌شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

[۳] استاد میکروب‌شناسی، مرکز تحقیقات بروسلوز، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

[۴] استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران

[۵] دانشجوی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

[۶] کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، مرکز تحقیقات انتقال خون، انستیتو آموزش و تحقیقات انتقال خون، همدان، ایران

* **نویسنده مسئول:** مریم صدرنیا، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران.

ایمیل: msadrnia@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۵/۲۸

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۲۵

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

چکیده

سابقه و هدف: امروزه به‌دلیل بروز مقاومت‌های دارویی و توانایی باکتری‌ها در ایجاد عفونت‌های حاد، استفاده از گیاهان به‌منظور بررسی اثرات ضدمیکروبی آن‌ها مطرح شده است. در این راستا، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر عصاره و میکرواملسیون تهیه‌شده از عصاره گل راعی (*Hypericum perforatum*) و آلوئه ورا (*Aloe vera*) بر باکتری بروسلا صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی با کمک هود در آزمایشگاه سطح ۲ انجام شد. بدین‌منظور، تعداد ۵۰ نمونه خون سرولوژی مثبت از نظر تب مالت در دستگاه BACTEC کشت داده شد و درصورت رشد، به محیط کشت *بروسلا* آگار در جار با اتمسفر حاوی ۱۰-۵ درصد CO_2 به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت منتقل گردید. درادامه، آزمایش‌های تأییدی بیوشیمیایی روی نمونه‌های رشدیافته اجرا شد. عصاره‌گیری به‌وسیله دستگاه رفلاکس (تقطیر) با حجم بالن ۱ لیتری ومبرد ۴۰ سانتی‌متری مارپیچ صورت گرفت. ساختار میکرواملسیونی با کمک امولسیفایرها از عصاره ساخته شد. سپس، از عصاره‌های آبی گل راعی و آلوئه ورا، رقت‌های ۱، ۲، ۴ و ۸ میلی‌گرم بر لیتر تهیه گردید و خواص ضدمیکروبی این عصاره‌ها با روش دیسک دیفیوژن، پورپلیت و انتشار چاهک روی کشت خالص *بروسلا*های جداشده از بیماران مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: ارزیابی خواص ضدمیکروبی بر سویه‌های *بروسلای* جداشده نشان داد که میانگین قطر هاله عدم رشد در سویه‌های مورد مطالعه برای غلظت ۸ تا ۱ میلی‌گرم بر لیتر عصاره گل راعی به‌ترتیب برابر با ۲±۳۶/۶ و ۳±۱۸ میلی‌متر و برای آلوئه ورا ۳±۳۰/۷ و ۱±۱۸ میلی‌متر بود و هیچ‌کدام از سویه‌ها در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تشکیل هاله ندادند. بررسی اثر عصاره به روش انتشار چاهکی نیز نتایج مشابهی داشت؛ اما در روش پورپلیت، تأثیر عصاره‌ها بر باکتری مشاهده نشد. شایان ذکر است که میکرواملسیون عصاره گل راعی به‌دلیل رقت زیاد بر سویه‌ها اثری نداشت.

نتیجه‌گیری: روش دیسک دیفیوژن زیر هود کلاس ۲، بهترین روش بوده و عصاره گل راعی، بیشترین تأثیر را بر *بروسلا* داشته است و برای مطالعات بالینی پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: آلوئه ورا، *بروسلا*، تب مالت، گل راعی، میکرواملسیون

مقدمه

بروسلا (*Brucella*)، باکتری کوکوباسیل گرم منفی بدون اسپور بی‌حرکت و داخل سلولی اختیاری است [۱،۲] که عامل بروسلوزیس در انسان و بسیاری از حیوانات می‌باشد. جنس *بروسلا* به شش گونه *ملی‌تنسیس* (*melitensis*)، *آبورتوس* (*abortus*)، *سوئیس* (*suis*)، *اویس* (*ovis*)، *کانیس* (*canis*) و *نئوتوم* (*neotomae*) تقسیم‌بندی شده است [۲].

در میان گونه‌های *بروسلا*، چهار گونه *بروسلای ملی‌تنسیس*، *بروسلای آبورتوس*، *بروسلای سوئیس* و *بروسلای کنیس* مهم‌ترین عامل ایجاد بیماری در انسان هستند [۳].

بروسلوز در تمام نقاط دنیا وجود دارد و از مشکلات بهداشتی

Archive of SID
www.SID.ir

در بسیاری از کشورها محسوب می‌شود. این بیماری در بسیاری از نقاط جهان، آندمیک بوده و در کشورهای در حال توسعه از شیوع بالایی برخوردار است [۲،۴-۶].

سازمان جهانی بهداشت (WHO: World Health Organization) تعداد موارد جدید بیماری بروسلوز در هر سال را ۵۰۰ هزار مورد گزارش نموده است که این مقدار بسیار کمتر از میزان واقعی محاسبه‌شده بروز بروسلوز انسانی می‌باشد [۷،۸].

بروسلوز یک بیماری با تظاهرات گوناگون است که تمام بافت‌ها و اندام‌های انسان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. علائم بالینی این بیماری به‌شدت غیراختصاصی بوده و تظاهرات بسیار متغیری را نشان می‌دهد؛ به‌طوری که به‌صورت یک سندرم تب‌دار همراه با علائم سیستمیک شامل: لرز، تعریق، سردرد، کمردرد، بی‌اشتهایی و کاهش وزن و یا به شکل بیماری‌هایی مانند: آرتریت، اسپوندیلیت، آندوکاردیت، مننژیت و غیره بروز می‌کند [۲،۴].

درمان بروسلوز با آنتی‌بیوتیک‌های رایج باعث کاهش درد و علائم بیماری و نیز کاهش عود مجدد و سایر عوارض ثانویه آن می‌شود؛ اما به‌دلیل حضور باکتری در داخل سلول‌های میزبان، استفاده از دارویی که قدرت نفوذ به درون سلول را داشته باشد، ضروری به‌نظر می‌رسد. سازمان بهداشت جهانی در سال ۱۹۸۶، رژیم دارویی داکسی سایکلین با ریفامپین یا استرپتومایسین را به مدت شش هفته به‌عنوان رژیم درمانی بروسلوز پیشنهاد نمود؛ اما هرکدام از این رژیم‌های درمانی دارای مضراتی می‌باشند؛ از جمله بروز عودهای مجدد و سمیت به‌ویژه در کودکان و زنان باردار. علاوه‌براین، دوره طولانی درمان نیز برای بسیاری از بیماران قابل تحمل نمی‌باشد و ممکن است مقاومت دارویی ایجاد نمایند [۹،۱۰].

امروزه به‌دلیل بروز مقاومت‌های دارویی و توانایی باکتری‌ها در ایجاد عفونت‌های حاد، استفاده از گیاهان به‌منظور بررسی اثرات ضدمیکروبی آن‌ها مطرح شده است. مطالعات متعدد اثبات کرده‌اند که بسیاری از گیاهان از توانایی بالایی علیه پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی انسانی برخوردار می‌باشند. در این راستا در بسیاری از کشورهای در حال توسعه، روش‌های درمانی سنتی متکی بر گیاهان هنوز اعتبار دارد و طبق برآورد سازمان بهداشت جهانی، بیش از ۸۰ درصد از مردم دنیا از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند [۱۱].

شایان ذکر است که حدود نیم تا یک‌سوم از محصولات دارویی عرضه‌شده در آمریکا منشأ گیاهی دارند [۱۲]. در طب سنتی از برخی گیاهان به‌عنوان گیاهان دارای خواص ضدمیکروبی نام برده شده که از این گیاهان در موارد ابتلا به تب مالت استفاده شده است. هم‌اکنون نیز برخی از این گیاهان در بین عشایر و مردم بومی برخی از نقاط ایران مانند استان چهارمحال و بختیاری، کهکیلویه و بویراحمد و ایلام برای درمان تب مالت استفاده می‌گردد [۱۳].

گل راعی با نام علمی *Hypericum perforatum* یک گیاه علفی از خانواده Hypericaceae است که بومی غرب اروپا، آسیا و شمال آفریقا می‌باشد. کاربرد این گیاه در چند سال اخیر به‌عنوان گیاه دارویی به‌ویژه برای درمان افسردگی ملایم تا متوسط به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است. ترکیبات شیمیایی این گیاه عبارت است از: پسودوهیپریسین، پیش‌ماده‌های پروتوهیپریسین و پروتوپسودوهیپریسین، ترکیب نادر سیکلوپسودوهیپریسین، فلاونوئیدهایی نظیر کامپفرول، کوئرستین، هیپروزید، ایزو کوئرستین، روتین، آمنتوفلاون، کاتیشن‌ها، بی‌فلاونویید‌ها، ادهیپرفورین، تانن‌ها، کافئیک، کلروژنیک و روغن‌های فرار مانند ژرانیول، میرسن، لیمونن، هیومیولن، کاریوفیلن، میریستیک، پالمتیک، استئاریک، کارتنوئیدها، کولین و نیکوتین آمید [۱۴]. افزون‌براین، اسانس و عصاره این گیاه علاوه‌بر درمان افسردگی، دارای فعالیت ضدویروسی و خاصیت معالجه زخم و آنتی‌باکتریالی می‌باشد [۱۵].

درمجموع هدف از مطالعه حاضر، تعیین اثر عصاره گیاه گل راعی و میکروامولسیون آن در مقایسه با عصاره *آلوئه ورا* (*Aloe vera*) بر باکتری مولد تب مالت در شرایط برون‌تنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری

در این مطالعه که به‌صورت تجربی و آزمایشگاهی انجام شد، نمونه خون از افرادی که با توجه به علائم بالینی و آزمایش‌های سرولوژیک به‌عنوان بیمار بستری یا تحت درمان شناخته شدند، تهیه گردید. تهیه نمونه‌ها و تأیید آن‌ها در بخش عفونی بیمارستان فرشچیان همدان صورت گرفت و آزمایش‌های میکروب‌شناسی در گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان انجام شد. درمجموع، ۵۰ فرد مشکوک به بروسلوز با آزمایش‌های سرولوژیک مثبت و علائم بالینی مورد مطالعه قرار گرفتند. لازم به ذکر است که این مطالعه در یک دوره ۱ ساله از اوایل سال ۱۳۹۲ تا اوایل سال ۱۳۹۳ انجام شد.

جهت انجام مطالعه، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر خون از افراد مشکوک به بیماری بروسلوز تهیه شد که ۷ میلی‌لیتر از آن‌ها برای کشت در محیط‌های BACTEC استفاده شد. ویال‌های BACTEC به مدت یک هفته در دستگاه نگهداری گردیدند و موارد مثبت به محیط‌های کشت *بروسلا* آگار (*Brucella* agar) منتقل شدند. محیط‌ها به مدت ۷۲ـ۴۸ ساعت در جار اتمسفر حاوی ۱۰-۵ درصد CO_2 و انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. ذکر این نکته ضرورت دارد که تمام محیط‌های کشت خون که توسط دستگاه BACTEC منفی اعلام می‌شد، از دستگاه خارج شده و به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل می‌گردید و به مدت ۳ هفته دیگر در انکوباتور حفظ می‌شد و درپایان هر هفته، Subculture از این محیط‌ها روی محیط‌های بلاد آگار (Blood agar) و *بروسلا* آگار صورت می‌گرفت. شایان توجه است که موارد منفی به مدت ۱۴ روز در دستگاه نگهداری [۸] و پس از شناسایی در رنگ‌آمیزی گرم، به‌وسیله آزمایش‌های اکسیداز، اوره‌آز، کاتالاز و تولید گاز H_2S تعیین هویت شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

تهیه گیاه

دو گیاه گل راعی و آلوئه ورا به‌صورت تازه از مزرعه گیاهان دارویی در شرق استان اصفهان تهیه شد و پس از چند مرتبه شستشو با آب به روش سنتی، در محلی به دور از نور خورشید و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (±۴) طی چند روز خشک گردید. پس از آن گیاهان خشک‌شده با استفاده از دستگاه خردکننده، آسیاب شدند.

تهیه عصاره از آلوئه ورا و گل راعی

عصاره آبی آلوئه ورا از برگ‌های گیاه و عصاره آبی گل راعی از کل بخش‌های آن با کمک فلاسک ومبرد ۴۰ سانتی‌متری به روش رفلاکس تهیه گردید.

برای شروع عصاره‌گیری، مقدار مشخصی از گیاه گل راعی خشک و آسیاب‌شده در بالن ریخته شد و با آب مقطر در حجمی معادل ۲/۵ برابر گیاه خشک، مخلوط گردید. درادامه، حرارت‌دادن به مدت ۶ ساعت در بن‌ماری در دمای جوش انجام شد؛ بدین‌ترتیب، عصاره گیاهی از تمامی اندام‌های گیاه گل راعی به‌دست آمد. برای صاف‌کردن عصاره‌ها و جداسازی مواد معلق ناخالص نیز از سانتریفیوژ استفاده گردید [۱۶].

همچنین به‌منظور تهیه عصاره آبی گیاه آلوئه ورا، مقدار ۱۰۰ گرم از ژل گیاه در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد رفلاکس شد و ترکیب حاصل‌شده در بالن تقطیر پس از سردکردن، صاف شده و به‌عنوان عصاره گیاهی مورد استفاده قرار گرفت.

تولید میکروامولسیون از عصاره گل راعی

ساختار میکروامولسیونی به‌دلیل توانایی آن در بالابردن اثر ضدمیکروبی، انتخاب خوبی برای واردکردن مؤثر عصاره در سلول است. در این روش با افزودن دو نوع امولسیفایر به عصاره آبی گل راعی و قراردادن روی استیرر، عصاره در درون نانومیسل به دام افتاد. شایان ذکر است که ساختار میسل متشکل از فسفولیپید بوده و به‌صورت کروی به قطر تقریبی ۵ تا ۱۰ نانومتر می‌باشد.

تهیه رقت از عصاره‌ها

از عصاره‌های تهیه‌شده از گیاهان آلوئه ورا و گل راعی با استفاده از آب مقطر استریل، غلظت‌های ۸ میلی‌گرم بر لیتر، ۴ میلی‌گرم بر لیتر، ۲ میلی‌گرم بر لیتر، ۱ میلی‌گرم بر لیتر و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تهیه گردید. میکروامولسیون نیز در غلظت‌های کاهشی از ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر تهیه شد.

روش دیسک دیفیوژن

روی محیط کشت مولر هینتون آگار (Mueller hinton agar) و نیز *بروسلا* آگار کشت تازه سویه کلینیکی در غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ معادل رقت نیم مک‌فارلند کشت چمنی گسترده انجام شد. سپس، دیسک‌های بلانک روی آگار قرار داده شد و روی هر دیسک، ۲۰ میکرولیتر از هرکدام از غلظت‌های عصاره و میکروامولسیون با کمک سمپلر ریخته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد از پشت پلیت با خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری گردید.

روش پورپلیت

مقدار ۰/۵ سی‌سی از هرکدام از رقت‌های عصاره و میکروامولسیون به پلیت افزوده شد و ۵ سی‌سی محیط کشت به آن اضافه گردید. سپس، پتری‌دیش‌ها به‌صورت پروانه‌ای حرکت داده شد تا عصاره به‌طور یکنواخت با محیط کشت مخلوط گردد. پس از انعقاد محیط کشت، تلقیح میکروب با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند و با استفاده از سواپ انجام شد.

روش انتشار چاهک

چاهک‌هایی با قطر ۵ میلی‌متر روی محیط *بروسلا* آگار ایجاد شد و پس از کشت باکتری از سوسپانسیون ۰/۵ مک‌فارلند توسط سواپ استریل، در هر چاهک حدود ۸۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره تلقیح گردید. سپس، پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و درپایان، هاله‌های عدم رشد باکتری‌ها توسط خط‌کش اندازه‌گیری گردید. درنهایت در نمونه شاهد، میکروب روی محیط کشت *بروسلا* آگار فاقد چاهک و عصاره کشت داده شد.

یافته‌ها

سویه‌های کلینیکی

کشت خون در مورد ۵۰ فرد مشکوک به بروسلوز که از نظر آزمایش‌های سرولوژیک مثبت بودند، انجام شد و ۳۹ نمونه کشت خون که به لحاظ رشد باکتری در دستگاه BACTEC مثبت بودند، روی *بروسلا* آگار برده شدند.

کلنی‌های *بروسلا ملی‌تنسیس* پس از ۴۸ ساعت به‌صورت کلنی کوچک، صاف و بدون همولیز روی محیط بلاد آگار و کلنی‌های کوچک و صاف روی محیط *بروسلا* آگار رشد یافتند [۱۷،۱۸].

برمبنای نتایج، تمام نمونه‌های خون کشت‌شده روی محیط کشت *بروسلا* آگار کوکوباسیل گرم منفی بودند؛ اما از نظر آزمایش‌های اوره‌آز، کاتالاز و اکسیداز، مثبت بودند. از سوی دیگر، تمام ویال‌های منفی به مدت ۳ هفته نگهداری شد وکشت مجدد صورت گرفت که نتیجه تمامی آن‌ها منفی بود.

نتایج دیسک دیفیوژن

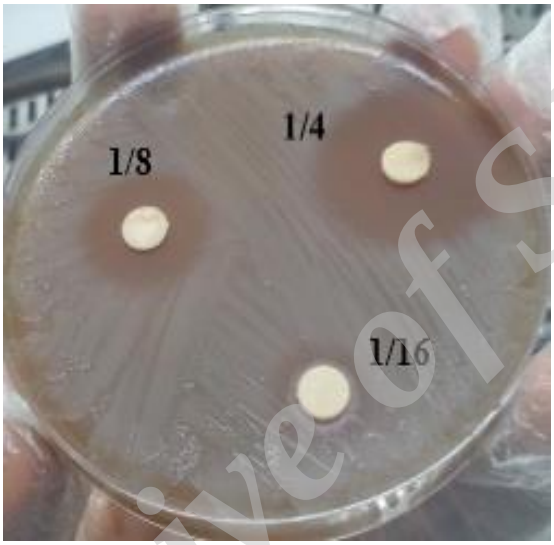
نتایج نشان داد که حداکثر و حداقل هاله عدم رشد برای غلظت ۸ میلی‌گرم بر لیتر عصاره گل راعی به‌ترتیب برابر ۴۰ و ۳۱ میلی‌متر در باکتری *بروسلا* می‌باشد؛ به‌طوری که در نمونه

Archive of SID
www.SID.ir

شماره ۱، بیشترین و کمترین قطر هاله به‌ترتیب ۴۰ و ۱۸ میلی‌متر، نمونه شماره ۲، ۳۱ و ۲۰ میلی‌متر، نمونه شماره ۳، ۳۸ و ۲۰ میلی‌متر، نمونه شماره ۴، ۳۸ و ۱۶ میلی‌متر و نمونه شماره ۵، ۳۶ و ۱۶ میلی‌متر نشان داده شد. علاوه‌براین، تمامی نمونه‌ها نسبت به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر مقاوم بوده و رشد نمودند (جدول ۱و شکل ۱).

جدول ۱: نتایج قطر هاله حاصل از تأثیر رقت‌های مختلف عصاره گل راعی (میلی‌گرم بر لیتر) در روش دیسک دیفیوژن بر حسب میلی‌متر

شماره نمونه	رقت عصاره				
	۸	۴	۲	۱	۰/۵
۱	۴۰	۳۷	۲۵	۱۸	عدم وجود هاله
۲	۳۱	۲۵	۲۵	۲۰	عدم وجود هاله
۳	۳۸	۳۳	۲۵	۲۰	عدم وجود هاله
۴	۳۸	۳۴	۲۸	۱۶	عدم وجود هاله
۵	۳۶	۲۹	۲۶	۱۶	عدم وجود هاله



شکل ۱: اثر عصاره گل راعی در روش دیسک دیفیوژن در غلظت‌های ۲، ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بر نمونه شماره ۲ *بروسلا*

نتایج انتشار چاهکی

در جدول ۲، قطر هاله‌های عدم رشد برای ۵ سویه *بروسلا* ارائه شده است. با توجه به این جدول مشخص می‌شود که بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به رقت ۸ میلی‌گرم بر لیتر در هر ۵ نمونه بوده و کمترین قطر هاله عدم رشد از آن رقت ۱ میلی‌گرم بر لیتر در هر ۵ نمونه می‌باشد. علاوه‌براین، بالاترین قطر هاله عدم رشد در رقت ۸ میلی‌گرم بر لیتر برای نمونه شماره ۱ برابر با۴۰ میلی‌متر و کمترین قطر هاله عدم رشد در رقت ۱ میلی‌گرم بر لیتر برای نمونه شماره ۳ به اندازه ۱۷ میلی‌متر است (جدول ۲ و شکل ۲).

نتایج پورپلیت

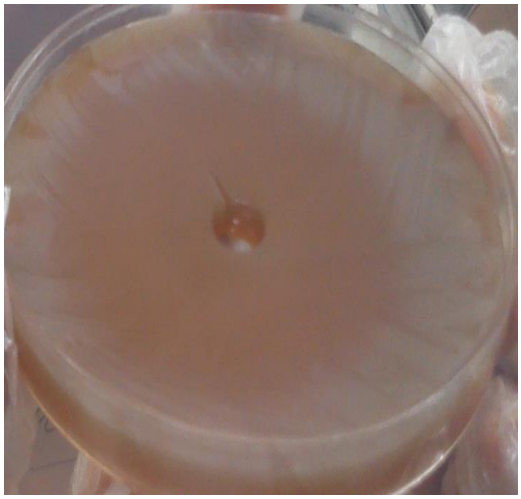
پس از کشت باکتری روی محیط کشت حاوی رقت‌های مختلف عصاره‌های هر دو گیاه، تمامی باکتری‌ها در ۵ رقت مختلف رشد کردند و نسبت به عصاره مقاوم بودند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که روش پورپلیت، روش مناسبی جهت بررسی اثر

جدول ۲: نتایج حاصل از بررسی تأثیر رقت‌های مختلف عصاره گل راعی (میلی‌گرم بر لیتر) به روش انتشار چاهکی بر حسب میلی‌متر

شماره نمونه	رقت عصاره				
	۸	۴	۲	۱	۰/۵
۱	۴۰	۳۵	۲۸	۲۱	عدم وجود هاله
۲	۳۱	۲۸	۲۳	۲۰	عدم وجود هاله
۳	۳۷	۳۲	۲۵	۱۷	عدم وجود هاله
۴	۳۸	۳۴	۲۸	۱۸	عدم وجود هاله
۵	۳۶	۲۹	۲۶	۱۸	عدم وجود هاله

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲: اثر عصاره گل راعی در روش چاهک در غلظت ۸ میلی‌گرم بر لیتر بر نمونه شماره ۲ *بروسلا*

عصاره نمی‌باشد.

نتایج بررسی اثر میکروامولسیون تولیدشده از عصاره گل راعی

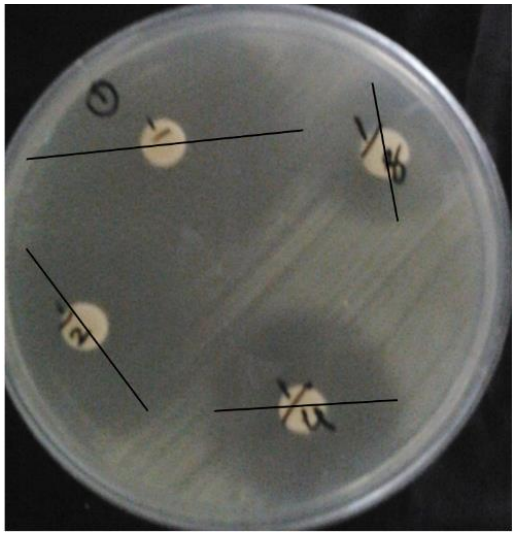
تمامی نمونه‌ها در رقت‌های مختلف عصاره به‌طور کامل رشد نمودند و هیچ‌گونه هاله‌ای را تشکیل ندادند؛ بنابراین به‌نظر می‌رسد که میکروامولسیون بسیار رقیق‌شده عصاره گل راعی، فعالیت ضدمیکروبی بر سویه‌های *بروسلا* ندارد.

نتایج دیسک دیفیوژن

حداکثر هاله عدم رشد برای عصاره آلوئه ورا در غلظت ۸ میلی‌گرم بر لیتر برابر با ۳۳ میلی‌متر در نمونه‌های شماره ۲ و ۳ و حداقل هاله عدم رشد در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر برابر با ۱۲ میلی‌متر در نمونه شماره ۴ از سویه‌های *بروسلا* بود؛ برای نمونه شماره ۱، بیشترین و کمترین قطر هاله به‌ترتیب ۳۲ و ۲۰ میلی‌متر؛ نمونه‌های شماره ۲ و ۳، ۳۳ و ۲۰ میلی‌متر و نمونه شماره ۴، ۲۵ و ۱۲ میلی‌متر به‌دست آمد (جدول ۳ و شکل ۳).

جدول ۳: نتایج حاصل از بررسی اثر رقت‌های مختلف عصاره آلوئه ورا (میلی‌گرم بر لیتر) به روش دیسک دیفیوژن بر حسب میلی‌متر

شماره نمونه	رقت عصاره			
	۸	۴	۲	۱
۱	۳۲	۲۸	۲۵	۲۰
۲	۳۳	۲۷	۲۵	۲۰
۳	۳۳	۳۰	۲۵	۲۰
۴	۲۵	۲۳	۱۸	۱۲



شکل ۳: اثر عصاره آلوئه ورا در غلظت‌های ۴، ۸، ۲ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر نمونه شماره ۱ *بروسلا* (غلظت ۱: ۲۵؛ غلظت ۲: ۱۵؛ غلظت ۳: ۱۲؛ غلظت ۴: ۱۰ میلی‌متر)

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

در این مطالعه اثرات سه ماده عصاره گل راعی، میکروامولسیون عصاره آن و عصاره آلوئه ورا بر سویه‌های بیماری‌زای بروسلای جداشده از بیماران مبتلا به تب مالت به سه روش دیسک دیفیوژن، پورپلیت و انتشار چاهک بررسی گردید.

با توجه به نتایج به‌دست آمده مشاهده شد که میکروامولسیون عصاره گل راعی، اثر مهاری بر رشد سویه‌های *بروسلا* ندارد. نکته قابل توجه این است که غلظت عصاره در ساختار میکروامولسیون، یک‌هشتادم عصاره معمولی است. به‌نظر می‌رسد که عدم اثر ضدباکتریایی میکروامولسیون می‌تواند با رقت بالای عصاره در آن و نیز غلظت پایین مواد مؤثر مرتبط باشد.

در روش دیسک دیفیوژن، نتایج متفاوتی از نظر هاله عدم رشد در عصاره‌های گل راعی و آلوئه ورا به‌دست آمد و تمامی سویه‌ها (به‌جز سویه شماره ۲) حساسیت بیشتری را نسبت به رقت‌های مختلف عصاره گل راعی در مقایسه با همین رقت‌ها از عصاره آلوئه ورا نشان دادند که در این میان، سویه شماره ۱ در مقایسه با سویه‌های دیگر دارای بیشترین حساسیت نسبت به رقت‌های مختلف عصاره گل راعی بود.

از سوی دیگر، نتایج نشان می‌دهند که در روش دیسک دیفیوژن برای عصاره آلوئه ورا و در هر دو روش دیسک دیفیوژن و انتشار چاهکی برای عصاره گل راعی، با افزایش غلظت عصاره در تمامی سویه‌ها، قطر هاله افزایش یافت؛ به‌طوری که بیشترین قطر در غلظت ۸ میلی‌گرم بر لیتر عصاره (بیشترین غلظت مورد آزمایش) و کمترین قطر هاله در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر عصاره (کمترین غلظت مورد آزمایش) مشاهده شد که این امر نشان‌دهنده ارتباط مستقیم بین غلظت عصاره و اثر ضدباکتریایی آن است.

علاوه‌براین، در مطالعه حاضر عصاره گیاه گل راعی با روش انتشار چاهک مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن مشابه با یافته‌های حاصل از روش دیسک دیفیوژن بود.

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان استنباط کرد که امکان استفاده از گل راعی و ترکیبات مختلف آن به‌عنوان ماده ضدمیکروبی در درمان بروسلوز وجود دارد. لازم به ذکر است که گل راعی فعالیت ضدمیکروبی وسیعی دارد؛ ازاین‌رو، امروزه با توجه به مشکلات عمده در درمان عفونت‌های مختلف و افزایش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و نیز داشتن قدرت درمانی در جهت درمان سایر بیماری‌ها می‌توان چنین نتیجه گرفت که گل راعی و ترکیبات آن می‌توانند برای درمان انواع مختلفی از بیماری‌ها به‌کار گرفته شوند.

در این زمینه، در مطالعه‌ای که شاپوری و همکاران به‌منظور بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره کلرفرمی سیر بر *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی‌تنسیس* به روش رقت در لوله و انتشار در آگار (روش انتشار چاهکی) انجام دادند، مشاهده شد که این عصاره با هر دو روش بر *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی‌تنسیس* مؤثر بوده و از رشد باکتری ممانعت کرده است [۱۹]. باید عنوان نمود که یافته‌های این مطالعه با نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر مطابقت داشت.

عنایت‌زاده میمندی و همکاران نیز در مطالعه‌ای نشان دادند که عصاره به‌دست آمده از اندام هوایی این گیاه، هیچ اثری بر کاهش روند رشد باکتری *بروسلا آبورتوس* نداشته است و نمی‌توان از آن در موارد ابتلا به تب مالت استفاده نمود [۲۰].

افزون‌براین، در مطالعه‌ای که اشراقی و همکاران به‌منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی گیاه گل راعی بر سوش‌های بیماری‌زای *نوکاردیا* (*Nocardia*) انجام داد، گزارش شد که عصاره متانولی این گیاه با استفاده از روش انتشار در آگار، تأثیر ضدمیکروبی قابل توجهی بر جلوگیری از رشد *نوکاردیا استروئیدس* (*Nocardia asteroides*) و *نوکاردیا برازیلینسس* (*Nocardia brasiliensis*) دارد [۲۱].

برخی از گونه‌های گل راعی در طب سنتی به‌عنوان داروی ضدافسردگی، ضددرد، ضدکرم، مدر، ضدعفونی‌کننده، التیام‌بخش و ترمیم‌کننده زخم و غیره به‌کار می‌رفته است. برمبنای مطالعات، ترکیبات مختلفی از این گونه گزارش شده است که فعالیت‌های زیستی خاصی را به آن نسبت می‌دهند؛ مانند: هایپریسین، سودوهایپریسین و فلاونوییدهای مختلف همچون کوئرستین، هایپرین، فلورگلوسینول و اسانس که اثرات مختلف ضدافسردگی، ضدمیکروبی و فعالیت ضدالتهابی از آن‌ها گزارش شده است [۱۵].

نتایج بررسی ضدباکتریایی در مطالعه حاضر نشان‌دهنده تأثیر قابل توجه عصاره آبی گل راعی بر سوش‌های بیماری‌زای *بروسلا* بود. باید عنوان نمود که اگرچه باکتری‌های به‌کار گرفته شده در مطالعه حاضر با سایر مطالعات تفاوت دارد؛ اما اثر مهارکنندگی عصاره گل راعی بر آن‌ها مشابه با مطالعات ذکرشده می‌باشد.

از سوی دیگر، در مطالعات مختلف ترکیبات گوناگون این گیاه که فعالیت‌های زیستی خاصی دارند، مورد بررسی قرار گرفته و اثرات مختلف ضدافسردگی، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدالتهابی و ضدسرطانی برای آن‌ها گزارش شده است [۲۲-۲۴].

در این راستا، نتایج مطالعه‌ای مشخص کرد که اقوام بومی استان چهارمحال و بختیاری برای درمان بیماری تب مالت از جوشانده گیاه چز کوهی استفاده می‌کنند. در بررسی جعفری کوخدان (۱۳۸۴) نیز گزارش شد که مردم بومی استان کهگیلویه و بویراحمد برای درمان بیماری تب مالت از ریشه زرشک کوهی (*Berberis vulgaris*) استفاده می‌کنند [۲۵].

همچنین، در مطالعه دیگری به بررسی اثر عصاره کلروفرمی سیر (*Allium sativum*) از تیره سوسن بر مورفولوژی و فیزیولوژی *بروسلا* پرداخته شد. طی این مطالعه مشخص گردید که آلیستین (ماده مؤثر موجود در پیازچه سیر که مهم‌ترین ماده

Archive of SID
www.SID.ir

ضدعفونی‌کننده سیر است) اثر ممانعت‌کننده مؤثری بر رشد باکتری *بروسلا* در شرایط In-vitro داشته است. همچنین نشان داده شد که اثر سیر بر *بروسلا*، به شرایط دمایی مختلف وابسته نبوده و اثر کشندگی خود را در همان دو ساعت اول بر باکتری مورد نظر اعمال می‌کند [۱۹].

علاوه‌براین، طی مطالعه‌ای که در ارتباط با تأثیر چند گیاه دارویی بومی ژاپن بر فعالیت روزانه موش‌های مبتلا به سندرم خستگی مزمن ناشی از تلقیح *بروسلا آبورتوس* انجام شد، مشخص گردید که هوکو ایکی تو می‌تواند اثر مهارکننده مؤثری بر کاهش فعالیت روزانه داشته باشد [۲۶].

ذکر این نکته ضرورت دارد که مطالعات بسیاری در ارتباط با اثرات ضدمیکروبی عصاره گونه‌های مختلف گل راعی در داخل و خارج از کشور صورت گرفته است. در مطالعات انجام‌شده در کشور ایران، بیشتر به بررسی اثرات ضدافسردگی، ضدالتهابی، ضدسردرد، ضدمیگرنی و ضدتشنجی گل راعی پرداخته شده و در پاره‌ای از مطالعات صورت‌گرفته در خارج از کشور نیز آثار ضدویروسی آن به‌ویژه علیه ویروس ایدز مدنظر قرار گرفته است [۲۷-۲۹].

با توجه به اینکه مطالعات انجام‌شده در داخل و خارج از کشور بر آثار متعدد گیاه گل راعی از جمله اثرات ضدمیکروبی آن (به‌ویژه بر میکروارگانیسم‌های گرم مثبت) متمرکز بوده است، طی مطالعه حاضر *بروسلا* به‌عنوان یک باکتری گرم منفی بیماری‌زا مورد استفاده و بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که تاکنون مطالعه مشخصی در ارتباط با تأثیر عصاره گل راعی بر *بروسلا* صورت نگرفته است و به‌نظر می‌رسد که مطالعه حاضر در نوع خود جدید باشد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر مشاهده شد که عصاره گل راعی و آلوئه ورا می‌توانند به‌عنوان ترکیبات *ضدبروسلایی* مطرح باشند. با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی و تقویت‌کننده‌گی سیستم ایمنی این عصاره‌ها، آن‌ها می‌توانند به‌عنوان مکمل دارویی در درمان معمول تب مالت استفاده شوند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از طرحی پژوهشی می‌باشد که با همکاری مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی دانشگاه علوم پزشکی اراک و مرکز تحقیقات بروسلوز دانشگاه علوم پزشکی همدان اجرا شده است. بدین‌وسیله پژوهشگران کمال تشکر و قدردانی را نسبت به کارکنان محترم هر دو مرکز ابراز می‌دارند. لازم به ذکر است که نتایج این مطالعه با منافع هیچ‌یک از نویسندگان در تعارض نمی‌باشد.

REFERENCES

1. Hosseini-Doust SR, Ahmadi A, Ahmadi Z, Hajia M, Safiri Z, Golmanesh L. Detection of brucella abortus by PCR assay and comparison with culture assay. *J Mil Med*. 2005;**7**(3):239-44. [Persian]
2. Pishva A, Salehi M, Ebrahimi M, Salehi R. Identification of brucella spp in central region of Iran. *Iran J Biol*. 2007;**20**(1):15-21. [Persian]
3. Zhouqi A, Samar G. Interpretation of brucellosis quick experiments. *J Nabz*. 1996;**6**:26-30. [Persian]
4. Haji Khani B, Sepehri Serasht S. Senior Microbiology. Tehran: Ibn Sina University Jihad; 2010.
5. Al-Eissa YA. Brucellosis in Saudi Arabia: past, present and future. *Ann Saudi Med*. 1999;**19**(5):403-5. PMID: 17277503
6. Bailey W, Scott EG. Diagnostic microbiology. 10th ed. New York: Elsevier Health Sciences; 1998.
7. Rezazadeh M, Hajilooi M, Rafiei A, Haidari M, Nikoopour E, Kerammat F, et al. TLR4 polymorphism in Iranian patiants with brucellosis. *J Infect*. 2006;**53**(3):206-10. Doi: 10.1016/j.jinf.2005.10.018
8. Maleknejad P, Peeri-Dogaheh H, AmirZargar AA, Jafari S, Fatollahzadeh B. Diagnosis of brucellosis by use of BACTEC blood culture and confirmation by PCR. *J Vet Res*. 2007;**62**(4):83-6.
9. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Garcia-Ordonez MA, Cardenas A, Colmenero JD. Development and evaluation of a PCR-enzym-linked immunosorbent assay for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol*. 2003;**41**(1):144-8. PMID: 12517839
10. Martínez de Tejada G, Pizarro-Cerdá J, Moreno E, Moriyon I. The outer membranes of brucella spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect Immun*. 1995;**63**(8):3054-61. PMID: 7622230
11. Serrentino J. How natural remedies work. New York: Harley and Marks Publishers; 1991. P. 20-2.
12. Clark AM. Natural products as a resource fornew drugs. *Pharm Res*. 1996;**13**(8):1133-44. PMID: 8865302
13. Pirbalouti AG. Medicinal plants used in Chaharmahal and Bakhtyari districts of Iran. *Herba Polonica*. 2009;**55**(2): 669-75.
14. Mirza M. Research of medicinal and aromatic plants. New York: Publications of Forests and Meadows;1998. P. 1.
15. Naghdi Badi H, Amin G, Makkizadeh M, Ziai SA. St. John's wort (Hypericum perforatum L.): a review. *J Med Plants*. 2005;**4**(16):1-4. [Persian]
16. Barnes J, Anderson A. Phillipson JD. St. John's wort (Hypericum perforatum L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol*. 2001;**53**(5):583-600. PMID: 11370698
17. Yagupsky P. Detection of Brucellosis in blood cultures. *J Clin Microbiol*. 1999;**37**(11):3437-42. PMID: 10523530
18. Bannatyne RM, Jackson MC, Memish Z. Rapid diagnosis of Brucella bacteremia by using the BACTEC 9240 system. *J Clin Microbiol*. 1997;**35**(10):2673-4. PMID: 9316932
19. Shapoury R, Sattari M, Mohammad Hassan Z. Study effect of garlic choloroformic extract (Allicin) on physiology and morphology of brucella. *J Med Plants*. 2004;**2**(10):15-22. [Persian]
20. Anayatzade Meimandi SA. Effect of Teucrium spp. And local name (Chez Kouhi) on Brucella abortus bacteria. [Master Thesis]. Shahrekord: Islamic Azad University, Shahrekord Branch; 2005. [Persian]
21. Eshraghi S, Amin G, Othari A. Evaluation of antibacterial properties and review of 10 medicinal herbs on preventing the growth of pathogenic nocardia species. *J Med Plants*. 2009;**88**(32):60-78. [Persian]
22. Cecchini C, Cresci A, Coman MM, Ricciutelli M, Sagratini G, Vittori S, et al. Antimicrobial activity of seven Hypericum entities from central Italy. *Planta Med*. 2007;**73**(6):564-6. PMID: 17516331 DOI: 10.1055/s-2007-967198
23. Kang BY, Chung SW, Kim TS. Inhibition of interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages by hpyericin, an active component of Hypericum perforatum. *Planta Med*. 2001;**67**(4):364-6. PMID: 11458458 DOI: 10.1055/s-2001-14333
24. Gartner M, Muller T, Simon JC, Giannis A, sleeman JP. Aristoforin, a novel stable derivative of hyperforin is a potent

Archive of SID

www.SID.ir

anticancer agent. *Chembiochem*. 2005;**6**(1):171-7. PMID: 15593112 DOI: 10.1002/cbic.200400195
25. Jafari Kookhdan AS. Traditional medicine in the great Qashqai. Proceedings of the National Conference on the Sustainable Development of Medicinal Plants, Mashhad, Iran; 2005. P. 647.
26. Xing, QW, Takashi T, Zhu SJ, Moriya J, Saegusa S, Yamakawa J, et al. Effect of Hochu-ekki-to (TJ-41), a Japanese Herbal Medicine, on daily activity in murine model of chonic fatigue syndrome. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2004;**1**(2):203-6. PMID: 15480446 DOI: 10.1093/ecam/neh020
27. Länger R. Die HMPC-Monographie zu Hypericum: Hintergründe, Entstehung, Inhalte. *WMW Wiener Med Wochenschrift*. 2010;**160**(21):557-63. DOI 10.1007/s10354-010-0846-6
28. Isacchi B, Bergonzi MC, Carnevali F, van der Esch SA, Vincieri FF, Bilia AR. Analysis and stability of the constituents of St. John's wort oils prepared with different methods. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;**45**(5):756-61. PMID: 17920801 DOI: 10.1016/j.jpba.2007.08.025
29. German pharmacopoeia, EB6 (Deutsches Arzneibuch. Suppl.). 6th ed. Bonn: Phytopharmaceutical Corporation; 1941. P. 409.

Archive of SID

www.SID.ir