بررسی مقایسه‌ای اثرات ضد باکتریایی ژل رویال و عسل طبیعی و ترکیب آن‌ها بر روی سویه استاندارد *هلیکوباکترپیلوری*

ناهید رحیمی فرد[1*]، بهرنگ حسین زاده[2]، شهرام شعیبی[1]

۱. اداره کل آزمایشگاه های مرجع کنترل غذا و دارو، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران.

۲. واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *nahidrahimifard@gmail.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۲۹

چکیده

حدود نیمی از جمعیت جهان به باکتری *هلیکوباکترپیلوری* آلوده بوده که باعث ایجاد زخم معده و دوازدهه، و در صورت عدم درمان و ریشه کنی منجر به سرطان معده می‌شود. درمان این بیماری آسان نبوده و نیاز به تجویز دوز بالایی از ترکیب چند آنتی بیوتیک دارد لذا یافتن درمان جایگزین، مانند یک محصول ضد میکروبی جدید از منابع طبیعی از جمله محصولات زنبور عسل مثل عسل و ژل رویال ضروری به نظر می‌رسد. عسل به واسطه اسمولاریته بالا، اسیدیته پائین، محتوای پراکسید هیدروژن و اجزای غیر پراکسیدی آن و ژل رویال به واسطه پروتئین رویالیزین، اسید چرب ترانس- ۱۰- هیدروکسی۲- دسنوئیک اسید، و پپتیدهای ژلینز دارای طیف وسیعی از فعالیت ضد باکتریایی می‌باشند. در این مطالعه خاصیت ضد *هلیکو باکترپیلوری* عسل آویشن و ژل رویال برداشت شده از کندوهای مستقر در منطقه دماوند و نیز ترکیب آن‌ها به روش تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد علیه سویه استاندارد *ATCC 43504* مورد ارزیابی قرار گرفت. این روش به عنوان یک روش استاندارد طلایی برای تعیین حساسیت میکروارگانیسم‌ها نسبت به مواد ضدمیکروبی شناخته شده است و مطابق با روش استاندارد موجود در گاید لاین BSAC انجام گردید. عسل آویشن، ژل رویال و مخلوط آن دو به همراه نمونه سفالکسین به عنوان کنترل مثبت، علیه سویه استاندارد *هلیکوباکترپیلوری*، اثرات ممانعت کنندگی از رشد را به ترتیب در غلظت‌های ۳۱٫۲۵، ۶۲٫۵، ۳۱٫۲۵ و ۰٫۰۶۲۵ نشان دادند. در این بررسی اثر هم افزایی عسل و ژل رویال مشاهده نشد.

کلید واژه ها: *هلیکوباکترپیلوری*، ژل رویال، عسل آویشن، اثرات ضد باکتریایی، MIC.

مقدمه

هلیکوباکترپیلوری یک باکتری گرم منفی و متحرک، میله‌ای و اسپیرال شکل بوده و در شرایط میکروآئروفیل رشد می‌کند. حدود نیمی از جمعیت جهان به این باکتری آلوده بوده که باعث ایجاد زخم معده و دوازدهه، و در صورت عدم درمان و ریشه کنی منجر به سرطان معده می‌شود. همچنین این بیماری با شیوع بسیار بالایی بخصوص در کشورهای در حال توسعه در حال گسترش می‌باشد. درمان این بیماری آسان نبوده و نیاز به تجویز دوز بالایی از ترکیب چند آنتی بیوتیک دارد که با استفاده مکرر و گسترده، علاوه بر عوارض جانبی، بروز مقاومت میکروبی به عنوان یک چالش مضاعف مطرح می‌باشد (رحیمی فرد، ۱۳۸۶). در سال ۱۹۹۴ *هلیکوباکترپیلوری* توسط سازمان بهداشت جهانی به عنوان عامل کارسینوژن کلاس ۱ معرفی شد (Yamada, 1994). در کنفرانس NIH در سال ۱۹۹۴ توصیه گردید که در تمام بیماران مبتلا به بیماری اولسر پپتیک ریشه کنی *هلیکوباکترپیلوری* انجام شود. تاکنون شواهد زیادی مبنی بر ارتباط بین عفونت *هلیکوباکترپیلوری* و لنفوم بافت‌های لنفاوی مرتبط با مخاط[1] به دست آمده است (Smoke, 2004). در افراد آلوده با *هلیکوباکترپیلوری* احتمال ایجاد سرطان معده ۶ برابر بیشتر از افراد غیر آلوده با این باکتری می‌باشد (Bustamante-Rengifo, 2013).

میزان شیوع آلودگی به *هلیکوباکترپیلوری* در کشورهای در حال توسعه بیشتر است، به طوری که بیش از ۸۰ درصد جمعیت این کشورها به این باکتری آلوده می‌باشند و حداقل ۵۰ درصد جمعیت انسانی جهان،

[1] Mucosa- associated lymphoid tissue Lymphoma

www.SID.ir

Archive of SID

عفونت *هلیکوباکترپیلوری* دارند (McColl, 2010) جهت ریشه کنی این باکتری رژیم‌های درمانی متنوعی استفاده می‌شود که طول درمان و نوع داروهای آن‌ها متفاوت است. این درمان آسان نبوده و نیاز به ترکیبی از آنتی بیوتیک‌ها و مواد یاور[1] غیرآنتی بیوتیکی دارد. آنتی بیوتیک‌های رایج آموکسی سیلین[2]، مترونیدازول[3]، کلاریترومایسین[4]، بیسموت[5]، تتراسیکلین[6] می‌باشند، یافته‌ها نشان می‌دهند که از بین املاح بیسموت، ساب سیترات بیسموت نه تنها اثر ضد باکتریایی قابل توجهی از خود نشان می‌دهد، بلکه چنانچه همراه تتراسایکلین و مترونیدازول مصرف گردد، فعالیت ضدباکتریایی بسیار موثرتری علیه *هلیکوباکترپیلوری* و درمان اولسرهای پپتیک خواهد داشت. آنتی بیوتیک‌ها به همراه یک مهار کننده پمپ پروتون[7] نظیر امپرازول در رژیم‌های درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد ولی علی رغم تمام راه کارهای درمانی جدید هنوز احتمال شکست درمانی وجود دارد (Bahremand, 2006). مقاومت *هلیکوباکترپیلوری* به گستره محدودی از آنتی بیوتیک-هایی که برای درمان موثر است می‌تواند تلاش برای از بین بردن این باکتری با استفاده از ترکیبات طبیعی بدون عوارض جانبی مانند محصولات زنبور عسل را توجیه نماید.

پتانسیل ضد میکروبی عسل به واسطه اسمولاریته بالا، اسیدیته پائین محتوای پراکسید هیدروژن همانند اجزای غیر پراکسیدی آن می‌باشد (Smoke, 2004). تولید پراکسید هیدروژن در عسل بطور آنزیمی صورت می‌گیرد (Aliyazicioglu, 2015) که توسط آنزیم گلوکز اکسیداز از اکسیداسیون گلوکز در حضور آب حاصل می‌شود. از سوی دیگر، ترکیبات غیر پراکسیدی (مواد شیمیایی گیاهی)[8] از گیاه یا ساخت زنبور از ترکیبات فلاونوئیدی[9] فنلی و فرار مشتق می‌شوند (Manyi-loh, 2012). همچنین در مطالعه مروری انجام شده توسط الرشودی و همکاران (۲۰۱۵) در ارتباط با فعالیت ضد میکروبی ژل رویال، اساسی ترین ترکیبات که در ژل رویال باعث فعالیت آن علیه عفونت‌های باکتریایی، قارچی و ویروسی می‌شود شامل پروتئین رویالیزین، اسید چرب ترانس- ۱۰- هیدروکسی۲- دسنوئیک اسید[10] که یک ترکیب منحصر بفردی است که فقط در ژل رویال یافت می-شود و طیف وسیعی از فعالیت ضد باکتریایی دارد و پپتیدهای ژلینز می‌باشد (Alreshoodi et al., 2015). مطالعات انجام شده بر روی ژل رویال خالص بیانگر این می‌باشد که اثر ضد باکتریایی آن بایستی رشد چندین نوع میکروب را ممانعت کند که شامل برخی از باکتری-های مقاوم شده به چند دارو مثل *استافیلوکوکوس*های مقاوم به متیسیلین[11] می‌باشد. هم چنین اثرات سینرژیک ترکیب ژل رویال با سایر محصولات مانند نشاسته یا عسل فعالیت ضد میکروبی را بطور قابل ملاحظه ای علیه پاتوژنهای خطرناکی مثل *سودوموناس آئروژینوزا*[12] و *استافیلوکوکوس اورئوس*[13] افزایش می-دهد (Alreshoodi, 2015). این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد *هلیکوباکترپیلوری* ژل رویال، عسل آویشن و همچنین ترکیب آنها برای مطالعه وجود احتمالی اثر هم افزایی بر روی سویه استاندار به روش تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد در شرایط in-vitro صورت پذیرفت.

روش کار

فعال سازی و آماده سازی نمونه میکروبی

[1] Adjuvant
[2] Amoxicillin
[3] Metronidazole
[4] Clarithromycin
[5] Bismuth
[6] Tetracycline
[7] PPI (Proton-pump inhibitor)

[8] Phytochemicals
[9] Flavonoids
[10] Trans-10-Hydroxy-2-Decenoic Acid(10-HAD)
[11] Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus(MRSA)*
[12] *P.aeruginosa*
[13] *S.aureus*

www.SID.ir

جهت انجام آزمون سنجش ضد میکروبی، به میکروب-های لیوفیلیزه در ویال، محیط کشت تریپتیک سوی براث[1] ساخت شرکت Merck آلمان با کد 1.5459.0500 اضافه کرده به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده و سپس بر روی محیط کشت تریپتیک سوی آگار[2] ساخت شرکت Merck آلمان با کد 1.5458.0500 کشت داده شد. پس از مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی با کدورت نیم مک فارلند مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه سوسپانسیون میکروبی

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی استاندارد، از محیط کشت تریپتیک سوی آگار حدود ۴ تا ۵ کلنی برداشت گردید و به داخل لوله آزمایش حاوی سرم فیزیولوژی انتقال و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از مدت ۲ تا ۵ دقیقه، کدورت لوله با کدورت استاندارد نیم مک فارلند مقایسه و به علت کدورت بیشتر با افزودن سرم فیزیولوژی استریل کدورت آن به کدورت استاندارد نیم مک فارلند رسانده شد.

تهیه رقت اولیه عسل و ژل رویال

۵ میلی‌لیتر از عسل مورد آزمایش توزین شد که معادل ۷/۵ گرم بود.[3] سپس ۵ میلی‌لیتر از ژل رویال مورد آزمایش نیز توزین شد که آن هم معادل ۷/۵ گرم بود. یعنی این دو ترکیب مورد آزمایش که از نظر غلظت ممانعت کنندگی از رشد باکتری با هم مقایسه می‌شوند دارای چگالی یکسانی بودند. در ادامه یک عدد فالکون ۵۰ میلی‌لیتری در پیچ دار استریل روی ترازو قرار داده و ترازو صفر گردید، ۵ گرم از نمونه عسل آویشن توسط قاشقک استریل داخل آن وزن شد و در ادامه ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول نرمال سالین استریل به آن اضافه کرده و در فالکون را بسته به خوبی تکان داده و محلول یکنواختی بدست آمد که غلظت آن برابر ۲ گرم در میلی‌لیتری شد. سپس یک عدد فالکون ۵۰ میلی‌لیتری در پیچ دار استریل روی ترازو قرار داده و ترازو را صفر نموده سپس ۵ گرم از نمونه ژل رویال توسط قاشقک استریل داخل آن وزن شد و در ادامه ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول نرمال سالین استریل به آن اضافه کرده و در فالکون را بسته به خوبی تکان داده و محلول یکنواختی بدست آمد که غلظت آن نیز برابر ۲ گرم در میلی‌لیتر شد.

تهیه رقت اول میکس

بعد از تهیه رقت‌های اول نمونه عسل و ژل رویال به مقدار ۱ سی سی از هر کدام توسط پیپت استریل جدا گانه برداشت و در یک لوله استریل کوچک به خوبی مخلوط گردید. غلظت نمونه ی مخلوط به دست آمده ۲ گرم در میلی‌لیتر بود.

تهیه محلول کنترل مثبت

برای تهیه این محلول ابتدا محتویات یک عدد کپسول سفالکسین ۵۰۰ میلی‌گرمی به طور کامل داخل یک عدد فالکون ۱۰۰ سی‌سی در پیچ دار استریل خالی شد و سپس تا خط ۵۰ سی‌سی، نرمال سالین استریل به آن اضافه و دربندی گردید و به شدت تکان داده شد تا پودر سفالکسین کاملاً حل شود. غلظت این محلول ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. سپس ۱ سی‌سی از این محلول به یک فالکون ۱۰۰ سی سی استریل دیگر منتقل و تا خط ۲۰ سی سی نرمال سالین استریل اضافه و به خوبی مخلوط گردید. رقت نهایی این محلول ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود.

مراحل انجام آزمون

در این مرحله برای هر کدام از ۳ نمونه، تا ۲۴ رقت سریالی و در سه تکرار همراه با کنترل مثبت و کنترل منفی در میکروپلیت‌های جداگانه ۹۶ چاهکی استریل مورد استفاده قرار گرفت، به این صورت که به وسیله سمپلر، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت تریپتیک

[1] Tryptic Soy Broth(TSB)
[2] Tryptic Soy Agar(TSA)
[3] d=m/v = 7.5/5=1.5 (v= حجم) (m= وزن) (d= چگالی)

www.SID.ir

Archive of SID

سوی براث ساخت شرکت Merck آلمان با کد 1.5459.0500 داخل همه چاهک‌ها ریخته شد و سپس با تعویض سر سمپلر مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رقت اولیه نمونه‌ها به چاهک اول از ردیف اول و سپس ۱۰۰ میکرولیتر در چاهک اول از ردیف چهارم و ۱۰۰ میکرولیتر در چاهک اول از ردیف هفتم ریخته و به خوبی مخلوط شد. رقت نمونه در این چاهک‌ها برابر ۱ گرم در میلی‌لیتر شد. به همین صورت رقیق سازی سریالی تا انتها انجام گرفت و ۱۰۰ میکرولیتر محلول برداشت شده از چاهک آخر دور ریخته شد. بالا ترین رقت ممکن تهیه شد و تا ۲۴ رقت سریالی ادامه یافت تا حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد نمونه در محدوده یکی از این رقت‌ها قرار گیرد.

سپس ۳ ردیف ۸ تایی از میکروپلیت خالی بود که در چاهک اول از ردیف شماره ده، با تعویض سر سمپلر، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده سفالکسین با رقت ۰.۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه و بخوبی مخلوط گردید. آنگاه، با برداشت ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول، رقت سازی سریالی تا انتهای ردیف دهم ادامه یافت و ۱۰۰ میکرولیتر محلول چاهک آخر دور ریخته شد این ردیف به عنوان کنترل مثبت آزمون بود. ردیف یازدهم به عنوان کنترل منفی فقط حاوی محیط کشت تریپتیک سوی براث و ردیف دوازدهم حاوی محیط کشت تریپتیک سوی براث و سوسپانسیون میکروبی جهت نشان دادن رشد میکروارگانیسم بود. میکروپلیت شماره ۱ برای نمونه عسل، شماره ۲ برای ژل رویال و شماره ۳ برای نمونه میکس تعیین گردید.

اضافه کردن سوسپانسیون میکروبی

با استفاده از سمپلر ۱۰ میکرولیتری کالیبره شده، در کنار شعله از سوسپانسیون میکروبی *هلیکوباکتر پیلوری* نیم مک فارلند، که قبلاً تهیه شده بود به مقدار ۱۰ میکرولیتر داخل چاهک‌های تمامی ردیف‌ها به غیر از ردیف یازدهم که به عنوان کنترل منفی بود، منتقل کرده و درهای میکروپلیت‌ها را گذاشته به آرامی تکان داده شد.

لود چاهک‌های میکروپلیت	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
۲۴ رقت سریالی نمونه + TSB + سوسپانسیون میکروبی تکرار ۱									۱
									۲
									۳
۲۴ رقت سریالی نمونه + TSB + سوسپانسیون میکروبی تکرار ۲									۴
									۵
									۶
۲۴ رقت سریالی نمونه + TSB + سوسپانسیون میکروبی تکرار ۳									۷
									۸
									۹
کنترل مثبت (رقت سریالی سفالکسین+ TSB + سوسپانسیون میکروبی)*									۱۰
کنترل منفی (TSB)									۱۱
سوسپانسیون میکروبی + TSB									۱۲

تصویر ۱- شکل شماتیک میکروپلیت ۹۶ چاهکی- محل‌های لود نمونه و کنترل‌ها

*با توجه به اینکه هدف از این آزمون سنجش خاصیت ضد میکروبی یک ترکیب می باشد لذا سفالکسین به عنوان یک آنتی بیوتیک، کنترل مثبت در نظر گرفته شده است.

www.SID.ir

انکوباسیون نمونه‌ها

با توجه به شرایط کشت *هلیکوباکترپیلوری*، نیاز به ایجاد شرایط میکروآئروفیلیک و مرطوب می‌باشد. به همین منظور یک عدد گاز پک نوع C شرکت مرک از جعبه خارج کرده و طبق دستورالعمل، ۶ میلی‌لیتر آب به آن اضافه و داخل جار شیشه ای گذاشته شد. سپس مقداری پنبه بهداشتی را خیس کرده، جهت تامین رطوبت محیط داخل جار، کنار گاز پک قرار داده شد و در ادامه هر سه میکروپلیت با درهای تقریباً نیمه باز داخل جار گذاشته شد و در آخر یک عدد شمع کوچک روشن درون جار قرار داده و سرپوش جار بسته شد. پس از خاموش شدن شمع، جار در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. بعد از مشخص شدن محدوده حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و حداقل غلظت از بین برنده باکتری[1]، این آزمون برای هر سه نمونه در ۸ رقت و سه تکرار همراه با کنترل مثبت و منفی در میکروپلیت شماره ۴ تکرار شد.

نتایج

بررسی نتایج با مشاهده کدورت ایجاد شده در چاهک-هایی که باکتری رشد کرده و شفافیت چاهک‌هایی که ماده ضد میکروبی ممانعت از رشد از خود نشان داده است، به دست آمد. نتایج حاصل از میکروپلیت شماره ۱ نمونه عسل نشان داد که آخرین چاهک شفاف (چاهک شماره ۶) با رقت ۳۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر معادل حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد، و رقت قبل آن یعنی چاهک شماره ۵ با رقت ۶۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر معادل حداقل غلظت از بین برنده باکتری بود. این مقادیر برای هر سه تکرار یکسان به دست آمد که نشان دهنده تکرار پذیر بودن آزمون بود.

مقادیر حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و حداقل غلظت از بین برنده باکتری برای کنترل مثبت آزمون، یعنی سفالکسین به ترتیب برابر ۰/۰۶۲۵ میلی‌گرم میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۰/۱۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. ردیف کنترل منفی که فقط حاوی محیط کشت تریپتیک سوی براث بود، تمامی چاهک‌های آن بدون رشد و شفاف مشاهده شد. کدورت تمام چاهک‌های ردیف آخر که حاوی محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی بود، نشان دهنده شرایط کشت مناسب و رشد باکتری یعنی زنده بودن باکتری و معتبر بودن آزمون بود.

نتایج میکروپلیت شماره ۲ نمونه ژل رویال نشان داد که آخرین چاهک شفاف (چاهک شماره ۵) با رقت ۶۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر معادل حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد، و رقت قبل آن یعنی چاهک شماره ۴ با رقت ۱۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برابر با حداقل غلظت از بین برنده باکتری می‌باشد.

در میکروپلیت شماره ۳ نمونه میکس، آخرین چاهک شفاف (چاهک شماره ۶) با رقت ۳۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برابر با حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و رقت قبل از آن یعنی چاهک شماره ۵ با رقت ۶۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برابر با حداقل غلظت از بین برنده باکتری بود.

مقادیر بدست آمده برای حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و حداقل غلظت از بین برنده باکتری مربوط به میکس دو نمونه عسل و ژل رویال معادل با مقادیر بدست آمده مربوط به عسل بود. با توجه به نتایج حاصله و برتری خاصیت ممانعت کننده از رشد عسل آویشن نسبت به ژل رویال، این برتری در مخلوط دو نمونه نیز بیان شد و اثر سینرژی در مخلوط این دو نمونه مشاهده نشد.

نتایج تکرار آزمون (میکروپلیت شماره ۴)

بعد از مشخص شدن محدوده رقت حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و حداقل غلظت از بین برنده باکتری، این آزمون برای هر کدام از نمونه‌ها در ۸ رقت و در یک میکروپلیت مطابق با جدول شماره ۱ انجام شده و نتایج قبلی بدست آمد.

[1] Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱. نتایج میکروپلیت شماره چهار (چاهک‌های زرد رنگ نشان دهنده کدورت و رشد باکتری می باشد)

	ستون ۱	ستون ۲	ستون ۳	ستون ۴	ستون ۵	ستون ۶	ستون ۷	ستون ۸
۸ رقت سریالی عسل در ۳ تکرار	۱ gr/ml	۰٫۵ gr/ml	۰٫۲۵ gr/ml	gr/ml ۰٫۱۲۵	mg/ml ۶۲٫۵ MBC	۳۱٫۲۵ mg/ml MIC	۱۵/۶۲۵ mg/ml	۷٫۸ mg/ml
	۱ gr/ml	۰٫۵ gr/ml	۰٫۲۵ gr/ml	gr/ml ۰٫۱۲۵	mg/ml ۶۲٫۵ MBC	۳۱٫۲۵ mg/ml MIC	۱۵/۶۲۵ mg/ml	۷٫۸ mg/ml
	۱ gr/ml	۰٫۵ gr/ml	۰٫۲۵ gr/ml	gr/ml ۰٫۱۲۵	mg/ml ۶۲٫۵ MBC	۳۱٫۲۵ mg/ml MIC	۱۵/۶۲۵ mg/ml	۷٫۸ mg/ml
۸ رقت سریالی ژل رویال در ۳ تکرار	۱ gr/ml	۰٫۵ gr/ml	۰٫۲۵ gr/ml	۰٫۱۲۵ gr/ml MBC	mg/ml ۶۲٫۵ MIC	۳۱٫۲۵ mg/ml	۱۵/۶۲۵ mg/ml	۷٫۸ mg/ml
	۱ gr/ml	۰٫۵ gr/ml	۰٫۲۵ gr/ml	۰٫۱۲۵ gr/ml MBC	mg/ml ۶۲٫۵ MIC	۳۱٫۲۵ mg/ml	۱۵/۶۲۵ mg/ml	۷٫۸ mg/ml
	۱ gr/ml	۰٫۵ gr/ml	۰٫۲۵ gr/ml	۰٫۱۲۵ gr/ml MBC	mg/ml ۶۲٫۵ MIC	۳۱٫۲۵ mg/ml	۱۵/۶۲۵ mg/ml	۷٫۸ mg/ml
۸ رقت سریالی میکس در ۳ تکرار	۱ gr/ml	۰٫۵ gr/ml	۰٫۲۵ gr/ml	gr/ml ۰٫۱۲۵	۶۲٫۵ mg/ml MBC	۳۱٫۲۵ mg/ml MIC	۱۵٫۶۲۵ mg/ml	۷٫۸ mg/ml
	۱ gr/ml	۰٫۵ gr/ml	۰٫۲۵ gr/ml	gr/ml ۰٫۱۲۵	۶۲٫۵ mg/ml MBC	۳۱٫۲۵ mg/ml MIC	۱۵٫۶۲۵ mg/ml	۷٫۸ mg/ml
	۱ gr/ml	۰٫۵ gr/ml	۰٫۲۵ gr/ml	gr/ml ۰٫۱۲۵	۶۲٫۵ mg/ml MBC	۳۱/۲۵ mg/ml MIC	۱۵٫۶۲۵ mg/ml	۷٫۸ mg/ml
سفالکسین (کنترل +)	۰٫۲۵mg/ml	۰٫۱۲۵mg/ml MBC	۶۲٫۵µg/ml MIC	۳۱٫۲۵ µg /ml	۱۵٫۶۲ µg/ml	۷٫۸۱ µg/ml	۳٫۹۰ µg/ml	۱٫۹۵ µg/ml
کنترل منفی	TSB	TSB	TSB	TSB	TSB+NS	TSB+NS	TSB+NS	TSB+NS
ردیف ۱۲	TSB+HP	TSB+HP	TSB+H	TSB+H	TSB+RJ	TSB+RJ	TSB	TSB

جدول ۲. مقادیر بدست آمده MIC و MBC برای نمونه‌های عسل و ژل رویال و میکس آن‌ها

نمونه‌ها / پارامترها	MBC mg/ml	MIC mg/ml
عسل	۶۲٫۵	۳۱٫۲۵
ژل رویال	۱۲۵	۶۲٫۵
نمونه میکس	۶۲٫۵	۳۱٫۲۵
سفالکسین	۰٫۱۲۵	۰٫۰۶۲۵

www.SID.ir

بحث

دنیای اطراف ما آکنده از عوامل عفونی است و بدون شک در کشورهای در حال توسعه که شاخص‌های بهداشتی مناسبی ندارند سبب بروز بیماری‌های عفونی متعدد نظیر بیماری‌های گوارشی می‌شوند از سوی دیگر بروز مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها هم معضلی بزرگ در رژیم‌های درمانی و توجیه کننده لزوم استفاده از سایر منابع طبیعی با اثر ضدمیکروبی به عنوان مکمل‌های درمانی بدون عوارض جانبی در کنار رژیم درمانی اصلی می‌باشد. در عصر حاضر گسترش روز افزون مقاومت میکروارگانیسم‌های مختلف به آنتی بیوتیک‌های رایج مصرفی به دلایلی مانند عدم تجویز صحیح، دوز نامناسب، مصرف خودسرانه و همچنین استفاده ناقص از داروها، موتاسیون در میکروارگانیسم، اثربخشی مداوم بسیاری از داروها که امروزه برای درمان بیماری‌های عفونی استفاده می‌شوند را تهدید می‌کند.

با توجه به فراوانی عفونت *هلیکوباکترپیلوری* در کشورهای در حال توسعه نظیر ایران، مقاومت بالای *هلیکوباکترپیلوری* به آنتی بیوتیک‌های رایج، افزایش سرطان معده، بروز عفونت‌های مکرر عود کننده و بیماران دچار عفونت‌های مزمن *هلیکوباکترپیلوری*، پیدا کردن داروها و عناصر طبیعی جایگزین همچنین مکمل‌های دارویی امری ضروری به نظر می‌رسد.

در آفریقای جنوبی نرخ مقاوم ۹۵/۵ درصدی برای مترونیدازول مستند شده است. همچنین مقاومت باکتریایی نسبت به تتراسایکلین، فلوروکوئینولون و ریفامپیسین، که به عنوان آنتی بیوتیک‌های جایگزین علیه *هلیکوباکترپیلوری* می‌باشند در حال ظهور هستند. مطالعات گوناگونی که بر روی محصولات طبیعی مختلف که فعالیت ضد *هلیکوباکترپیلوری* آن‌ها مستند شده شامل گیاهان، پروبیوتیک‌ها و محصولات زنبور عسل می‌باشد (Manyi-loh, 2012).

در ایران تأثیر عصاره الکلی زنجبیل بر روی ۲۰ سویه *هلیکوباکترپیلوری* جدا شده از بیماران مراجعه کننده با مشکلات گوارشی بررسی شده و اثر بازدارندگی از رشد توسط عصاره زنجبیل گزارش گردیده است (Rahimifard et al., 2008).

در مطالعه ای دیگر اثر ضد *هلیکوباکترپیلوری* عصاره ریشه شیرین بیان جمع آوری شده از رویشگاه‌های مختلف ایران را بر روی نمونه‌های بالینی جدا شده از بیماران در حین آندوسکوپی، مورد مطالعه قرار داده اند. در این بررسی‌ها اثر ممانعت‌کنندگی از رشد عصاره ریشه شیرین بیان علیه *هلیکوباکترپیلوری* ارزیابی و گزارش شده است (شعیبی و همکاران، ۱۳۸۹).

سید اشراقی و همکاران (۲۰۰۵) اثر ضد باکتریایی ژل رویال را علیه شش باکتری مختلف شامل *اشریشیا کلی*[1]، *استافیلوکوکوس اورئوس*[2] و *استرپتومایسس گریزئوس*[3] و سه سویه کلاس‌بندی نشده از استرپتومایسس مورد بررسی قرار داده‌اند. در این آزمون ۴ رقت از عصاره آبی ژل رویال خالص آماده شده و به روش نفوذ در آگار و اندازه گیری قطر هاله عدم رشد، اثر مهار کنندگی از رشد باکتری توسط عصاره ژل رویال ارزیابی و مورد تایید قرار گرفته است. همچنین مشتقات محلول در اتر و غیر محلول در اتر ژل رویال توسط سید اشراقی و همکاران به روش فوق مورد بررسی واقع شده و مشخص گردید که مشتقات محلول در اتر (اسید چرب 10-HDA) اثر ضد باکتریایی بیشتر نسبت به مشتقات غیر محلول در اتر (پروتئین رویالیزین) دارند (Syeed Eshraghi et al., 2005).

کریستی مانیلو (2010) با مطالعه اثر ضدباکتریایی شش نوع عسل انتخابی آفریقای جنوبی در ۴ رقت به روش نفوذ در آگار و همچنین عصاره‌های محلول آن‌ها در کلروفرم، ان هگزان، دی اتیل اتر و اتیل استات به روش MIC، مشخص نمود که تمامی واریته‌های عسل مورد آزمایش و هم چنین عصاره‌های محلول آن‌ها در

1 Escherichia coli
2 Staphylococcus aureus
3 Streptomyces griseus

www.SID.ir

Archive of SID

سطوح مختلفی اثر ضدباکتریایی بر روی سویه جدا شده کلینیکی از *هلیکوباکترپیلوری* از خود نشان داده اند (Manyi-loh, 2010).

در مطالعه حاضر با توجه به گسترش آلودگی با *هلیکوباکترپیلوری* در بین افراد مختلف جامعه کشورمان و ظهور مشکلات فراوان به دنبال شیوع این عفونت مانند تحمیل هزینه‌های فراوان برای درمان و پیشگیری، همچنین ایجاد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های مصرفی، اثر ضد *هلیکوباکترپیلوری* دو محصول زنبور عسل بومی کشور ایران، عسل آویشن و ژل رویال به روش MIC مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج بدست آمده از این آزمون‌ها موید اثر ممانعت کنندگی از رشد و کشندگی بر روی سویه استاندارد این باکتری می‌باشد.

بر اساس نتایج بدست آمده، عسل آویشن در رقت ۳۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر خاصیت ممانعت کنندگی از رشد داشته و در رقت ۶۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از بین برنده *هلیکوباکترپیلوری* می‌باشد که در مقایسه با نتایج متناظر آنتی بیوتیک سفالکسین که به عنوان کنترل مثبت استفاده شد، یعنی رقت‌های ۰/۰۶۲۵ و ۰/۱۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، می‌توان نتیجه گیری کرد که برای موثر واقع شدن نمونه عسل بر علیه این باکتری بایستی از غلظت بالاتری نسبت به آنتی بیوتیک‌ها استفاده گردد که با توجه به نداشتن عوارض جانبی این محصول طبیعی، استفاده از آن قابل توجیه می‌باشد. همچنین در مورد نمونه ژل رویال بدست آمدن مقادیر ۶۲/۵ و ۱۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب به عنوان رقت‌های ممانعت کننده از رشد و از بین برنده، بیانگر این موضوع می‌باشد که خاصیت ضد*هلیکوباکترپیلوری* ژل رویال نسبت به عسل آویشن در سطح پایین‌تری می‌باشد و از طرفی با توجه به مقادیر متناظر به دست آمده مربوط به نمونه میکس، یعنی ۳۱/۲۵و ۶۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ، که برابر با مقادیر متناظر با نمونه عسل می‌باشد، با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق و نتایج بدست آمده در مطالعات قبلی می‌توان نتیجه گیری کرد که اولاً برتری خاصیت ضد *هلیکوباکترپیلوری* عسل نسبت به ژل رویال در ترکیب با هم ظهور کرده و ثانیاً انتظار به دست آمدن اثر هم افزایی که بر اساس مطالعات بوکرا (2008) با اضافه کردن ژل رویال به عسل خاصیت ضد میکروبی آن علیه *سودوموناس آئروژنوزا*[1] را افزایش می‌داد (Boukraa, 2008) خاصیت هم افزایی این مخلوط علیه *هلیکوباکترپیلوری* مشاهده نشد.

منابع

۱. رحیمی‌فرد، ناهید. ۱۳۸۶. هلیکوباکتر پیلوری باکتری عامل عفونت معده. چاپ اول، انتشارت تیمور زاده:طبیب، صفحات ۱-۸.

۲. شعیبی، شهرام.، حاجی‌مهدی پور، هما.، رحیمی فرد، ناهید.، رضازاده، شمسعلی. ۱۳۸۹. مقایسه اثرات ضد *هلیکوباکتر پیلوری* ریشه شیرین بیان جمع آوری شده از رویشگاه‌های مختلف ایران. فصلنامه گیاهان دارویی، سال نهم، دوره چهارم، شماره ۳۶، صفحات ۴۷-۴۳.

3. Aliyazicioglu, R. 2015. Honey: The Natural Inhibine. Bentham Science Publishers. 13: 42-49.

4. Alreshoodi, F.M. 2015. Antimicrobial Activity of Royal Jelly. Bentham Science Publishers. 13: 50-59.

5. Bahremand S, N. L. 2006. Evaluation of triple and quadruple *Helicobacter pylori* eradication therapies in Iranian children: a randomized clinical trial. Europ J Gastro hepatol. 511-15.

6. Boukraa, L. 2008. Additive Activity of Royal Jelly and Honey Against *Pseudomonas aeruginosa*. Alternative Medicine Review. 4: 13.

7. Bustamante-Rengifo JA, M. A. 2013. In vitro effect of amoxicillin and clarithromycin on the 3' region of cagA gene in *Helicobacter pylori* isolates. World J Gastr. 19: 6044-6054.

1 Pseudomonas aeruginosa

www.SID.ir

8. Manyi-loh, C. 2010. Treatment of Helicobacter pylori infections: Mitigating factors and prospective natural remedies. African J Biotech. 9: 2032-2042.
9. Manyi-loh, C. 2012. Antibacterial and phytochemical studies of selected South African honeys on clinical isolates of *Helicobacter pylori*. University of Fort Hare Electronic Theses, 1-181.
10. McColl, K. 2010. Clinical practice Helicobacter pylori infection. The New England journal of medicine. 1597-1604.
11. Rahimifard, N., Rabiei, M., Beitolahi, L., and Ahi, K. 2008. *Helicobacter Pylori* and the herbal compound effect. Biosc Biotech Res Asia. 9: 235-238.
12. Smoke T, S. I. 2004. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC, Lyon, 1-1452.
13. Syeed Eshraghi, S. 2005. An evaluation of the potent inhibitory efects of Royal Jelly fractions against Streptomyces bacteria. Pak J Med Sci. 1: 25-30.
14. Yamada T, S. J. 1994. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. Jama. 65-69.

www.SID.ir

Archive of SID

The comparative study of antibacterial effects of Royal Jelly and Honey and the combination of them against standard strain of *Helicobacter pylori*

Rahimifard N[1*], Hosseinzadeh Shanjani B[2], Shoeibi S[1]

1. Food and Drug control laboratories (FDCL), Food and Drug Laboratories Research center (FDLRC). Iran Food and Drug Administration (IFDA), Ministry of Health and education, Tehran, Iran

2. Central Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

***Corresponding author:** *nahidrahimifard@gmail.com*

Received: 19 January 2019 Accepted: 18 April 2019

Abstract

Helicobacter pylori is a Gram-negative, microaerophilic spiral rod. About half of the world population is infected with the bacteria that cause gastric and duodenal ulcers, and if untreated and eradication lead to the gastric cancer. Treatment is not easy and requires the administration of high doses of combination antibiotic with extensive and repeated use, in addition to side effects, the incidence of bacterial resistance as a double challenge is posed. So finding an alternative treatment, such as new natural antimicrobial resources including bee products such as honey and royal jelly is necessary. Honey due to high osmolality, low acidity, and content of hydrogen peroxide and non-peroxide components and royal jelly because of Royalisin protein, fatty acid Trans-10-Hydroxy-2- Decenoic acid (10-HAD) and Jelleins peptides; they have a wide spectrum of antibacterial activity. In this study, anti-*Helicobacter pylori* property of thyme honey and Royal Jelly, harvested from hive located in Damavand region near Tehran-Iran, and mixture of them, against the standard strain of *H.pylori ATCC 43504*, was evaluated by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method. This method as the golden standard technique for determining the sensitivity of microorganisms to antimicrobial agents has been known and in accordance with standard procedures in the British Society For Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) guidelines, was performed. Thyme honey and Royal Jelly and their mixture with positive control sample as cephalexin, had respectively 31.25, 62.5, 31.25, 0.0652 mg/ml MIC against standard strain of *H. pylori*. There was no synergy effect between honey and Royal Jelly in this study.

Keywords: Anti- bacterial effects, Royal Jelly, Thyme Honey, MIC.

www.SID.ir