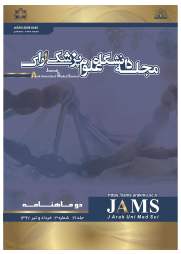
JAMS

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک

دوره بیست و یک، شماره سه، خرداد و تیر ۱۳۹۷

journal homepage: http://jams.arakmu.ac.ir



مقاله پژوهشی

مقایسه دو روش انتشار دیسک و میکروپلیت دایلوشن در بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره برگ مورد بر استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به متی سیلین و اشرشیاکلی ESBL

مریم صدرنیا[1*]، قاسم حبیبی[2]، محمد ارجمندزادگان[3]

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

۲. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

۳. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی،گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۰۵

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۱۹

تاریخ انتشار: ۹۷/۰۳/۰۱

واژگان کلیدی:

انتشار دیسک

میکروپلیت دایلوشن

عصاره برگ مورد

MRSA

اشرشیاکلی ESBL

*نویسنده مسئول:

مریم صدرنیا

آدرس پستی: ایران، تهران، دانشگاه پیام نور، گروه زیست شناسی.

تلفن: 8302 862 918 98+

نمابر:

E-mail: msadrnia@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: این مطالعه اثر عصاره گیاه مورد بر روی ۲۵ سویه دو گونه بیماری‌زای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین(MRSA) و اشرشیا کلیESBL جدا شده از بیماران را با دو روش مقایسه نمود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۱۵سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین(MRSA) و ده سویه اشرشیاکلی ESBL مورد استفاده قرار گرفتند. برگ گیاه مورد به صورت تازه از مزرعه گیاهان دارویی تهیه گردید. عصاره‌گیری با استفاده از دستگاه رفلاکس به روش تقطیر انجام شد. اثر غلظت‌های ۱۰۰-۰/۱۹۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره روی سویه‌ها، در روش انتشار دیسک در مقایسه با روش میکروبراث دایلوشن با کدورت سنجی و نیز با روش MTT در دستگاه خوانش الیزا با طول موج ۵۴۵ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: قطر هاله عدم رشد برای حداقل غلظت موثر ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر، در سویه‌های مختلفESBL و MRSA به صورت میانگین به میزان ۱±۸ و ۱ ± ۱۱ میلی‌متر بود. حداقل غلظت مهار رشد(MIC) ۶/۲۵ میکروگرم برمیلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی(MBC) ۱۲/۵میکروگرم بر میلی‌لیتر برای اشرشیا کلی ESBLتعیین شد. به علاوه، حداقل غلظت مهار رشد (MIC) ۱۲/۵میکروگرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی(MBC) ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای استافیلوکوکوس اورئوس MRSA تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه عدم انطباق دقیق دو روش را در سویه‌های کلینیکی مقاوم به دارو اثبات نمود. اثبات گردید که روش انتشار دیسک، محدوده غلظت را مشخص نموده و روش میکروپلیت، غلظت موثر را با دقت تعیین می‌نماید. پیشنهاد می‌شود در مطالعات طب سنتی، روش انتشار در محیط جامد مبنای تصمیم گیری قرار نگیرد. رفتار باکتری در محیط مایع و به‌ویژه تعیین نقطه مرگ، دقت نتایج را بسیار افزایش می‌دهد.

تمامی حقوق انتشار این اثر، متعلق به دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد.

www.SID.ir

۱. مقدمه

امروزه کارایی بسیاری از مواد آنتی بیوتیکی به دلیل بیان گسترده ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک از دست رفته است. به علاوه استفاده از این آنتی بیوتیک‌ها اثرات جانبی بسیاری از قبیل واکنش افزایش حساسیت علیه آنتی بیوتیک، سرکوب ایمنی و غیره دارند (۱). گسترش گونه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی بیوتیک، یکی از مشکلات عمده بهداشتی بوده و موجب کاهش تعداد آنتی بیوتیک‌های قابل استفاده جهت کنترل عفونت‌ها شده است. از طرفی، آنتی بیوتیک‌های موثر دارای عوارض جانبی متعددی می‌باشند (۲). باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، کوکسی گرم مثبت بدون اسپوری است که از عوامل مهم ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. این باکتری می تواند سبب بروز بیماری‌هایی نظیر کورک، سندروم شوک توکسیک، اندوکاردیت، استئومیلیت و غیره شود (۳). به علاوه، این باکتری به سرعت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها مقاومت پیدا کرده و این قابلیت را دارد که همزمان نسبت به چندین آنتی بیوتیک از خود مقاومت نشان دهد (۴، ۵).

با توجه به عوارض جانبی آنتی بیوتیک‌ها و همچنین مقاومت باکتری‌هایی مانند استافیلوکوکوس اورئوس(Methicillin-resistant Staphylococcus aureus-MRSA) به این آنتی بیوتیک‌ها توجه به اثرات ضد میکروبی عصاره طبیعی برخی گیاهان مورد توجه است (۶). استفاده از گیاهان دارویی از قدیم الایام مورد توجه بوده و افزایش غلظت ترکیبات موثره در عصاره حاصل از گیاه و تأثیر بیشتر آن نسبت به خود گیاه دارویی، استفاده از عصاره‌ها را مطلوب‌تر نموده است (۷).

باکتری اشرشیاکلی، مقاوم به بتالاکتام (Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL, ، باسیلی گرم منفی است که عامل بسیاری از عفونت‌ها می‌باشد. اثرات ضد میکروبی عصاره برخی گیاهان در افزایش مدت زمان نگهداری مواد غذایی و ممانعت از رشد باکتری‌ها از جمله اشرشیاکلی به اثبات رسیده است. یافتن عصاره‌های گیاهی بیشتر و خالص-سازی ترکیبات موثر آن‌ها جهت استفاده در کنترل عفونت‌ها می تواند یک راه‌کار مفید باشد(۸). یکی از انواع گیاهان دارویی به نام مورد، درختچه‌ای همیشه سبز بوده و به صورت خودرو در دشت‌های ایران و سایر کشورهای دارای آب و هوای مدیترانه ای رشد می‌کند. این گیاه از گذشته مورد توجه بوده و از اثرات ضدعفونی‌کنندگی آن استفاده می‌شده است. علاوه بر اثرات تقویت کنندگی معده و قابض، در طب سنتی از عصاره گیاه مورد به عنوان ضدعفونی کننده نیز استفاده می‌شود (۹).

آریدوگان و همکاران در یک مطالعه آزمایشگاهی اثر اسانس و عصاره گیاه مورد را بر روی انواعی از باکتری‌ها بررسی نموده و نتیجه گرفتند که اسانس مورد می تواند مانع رشد استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی گردد (۱۰). در این تحقیق طی ارزیابی اثرات ضدمیکروبی عصاره برگ مورد بر باکتری‌های مقاوم به دارو، دو روش کربی بائر و میکروپلیت مقایسه می‌شوند.

۲. ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با کد اخلاقی IR.ARAKMU.REC.1394.127 به تصویب کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک رسیده است.

۳. مواد و روش‌ها

تهیه گیاه

در این مطالعه تجربی، گیاه دارویی مورد به صورت تازه از مزرعه گیاهان دارویی تهیه گردید. قبل از خشک کردن، گیاه چند بار با آب شستشو داده شده و سپس در محلی تاریک و به دور از نور خورشید در دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد طی چند روز خشک و سپس آسیاب شد.

تهیه عصاره آبی

عصاره‌گیری با استفاده از دستگاه رفلاکس به روش تقطیر انجام شد. این دستگاه مشتمل بر بالن با حجم یک لیتر و مبرد مارپیچ است. تهیه عصاره با استفاده از برگ‌های گیاه صورت گرفت. جهت تهیه عصاره آبی ۱۰۰گرم پودر برگ و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون بالن با هم مخلوط شده، سپس این

Archive of SID
www.SID.ir

مخلوط به مدت ۴ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. در نهایت، فرآیند تقطیر درون مبرد انجام گرفته و عصاره گیاهی به دست آمد. عصاره حاصله پس از صاف شدن مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه سویه باکتری

سویه‌های شناسایی شده استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) (۱۵ سویه) و اشرشیاکلی ESBL (ده سویه) از سویه‌های جدا شده از بیماران از بخش میکروبی مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی دانشگاه علوم پزشکی اراک اخذ گردیدند.

تهیه سوسپانسیون میکروبی با غلظت استاندارد

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، ابتدا استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و اشرشیاکلی ESBL روی محیط بلادآگار (های مدیا- هند) کشت داده شدند. سپس از کلنی‌های موجود در کشت‌های میکروبی تازه، با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیون تهیه شده و با مقایسه نمونه تهیه شده با نیم مک فارلند استاندارد، غلظت نیم مک فارلند از باکتری‌ها تهیه گردید.

بررسی حساسیت باکتری‌ها نسبت به عصاره گیاهی به روش انتشار دیسک

در این روش، حساسیت باکتری به عصاره‌های گیاهی از غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تا ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶، ۰/۷۸، ۰/۳۹، ۰/۱۹۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفت. روش کار بدین صورت است که بعد از تهیه سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند (۱/۵ ×۱۰۸cfu/ml)، کشت سوسپانسیون به صورت سفره‌ای روی محیط مولر هینتون اگار (های مدیا- هند) انجام شده و دیسک بلانک آغشته به عصاره مورد با غلظت‌های فوق روی محیط کشت در فاصله با دیواره پلیت قرار داده می‌شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه قرار داده شده و بعد از سپری‌کردن دوره انکوباسیون، قطر هاله عدم رشد باکتری بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

تعیین حساسیت میکروبی به روش کدورت‌سنجی

تعیین حساسیت میکروبی به روش کدورت سنجی با استفاده از میکروپلیت و محیط کشت مولر هینتون براث انجام شد. در این روش از کشت ۲۴ ساعته باکتری با غلظت نیم مک فارلند سوسپانسیون تهیه شده و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر درون چاهک‌های حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های کاهشی عصاره مورد اضافه شد. پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد میزان کدورت ایجاد شده یک بار بدون استفاده از رنگ و بار دوم با استفاده از رنگ MTT در طول موج ۵۴۵ نانومتر خوانده شد.

جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) از کشت چاهک‌ها در محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد.

جهت استفاده از رنگ، ابتدا رنگ MTT را به نمونه حاوی باکتری افزوده شده و مخلوط به دست آمده به مدت دو ساعت در دمای محیط نگهداری گردید. سپس محلول رویی از روی رسوب رنگ برداشته شد. نهایتا مازاد رنگ با بافر شسته شده و رنگ رسوب یافته ایجاد شده با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۵ نانومتر خوانده شد. از کنترل مثبت (سوسپانسیون باکتری در محیط کشت مولر هینتون براث بدون حضور عصاره گیاهی) و کنترل منفی (عصاره گیاهی و محیط کشت مولرهینتون بدون حضور باکتری) به عنوان نمونه‌های شاهد در دو چاهک انتهایی هر ردیف استفاده گردید.

۴. یافته‌ها

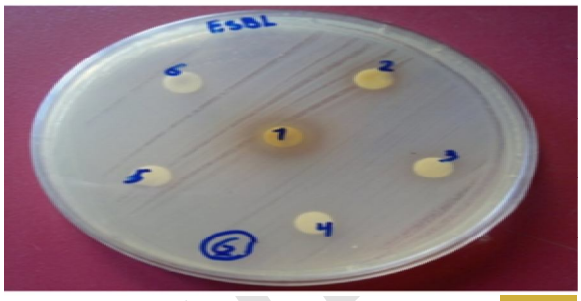
نتایج روش انتشار دیسک

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره گیاه مورد به روش کربی بائر برای باکتری اشرشیاکلی ESBL در غلظت‌های ۱۰۰ ، ۵۰ ،۲۵، ۱۲/۵ ، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر وجود اثر ضد میکروبی این عصاره را در غلظت‌های ۱۰۰ و۵۰ نشان داد. قطر هاله عدم رشد برای این دو غلظت در سویه‌های مختلف به صورت میانگین به میزان۲ ±۱۰ و ۱± ۸ میلی‌متر بود (شکل ۱ و جدول ۱). هم‌چنین یافته‌های حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی گیاه مورد بر روی باکتری استافیلوکوکوس

Archive of SID

www.SID.ir

اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) به روش کربی بائر، در غلظت‌های ۱۰۰ ، ۵۰ ،۲۵، ۱۲/۵ ، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد که عصاره این گیاه در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰ بر باکتری موثر است. هاله‌های مشاهده شده به ترتیب دارای قطر۲ ± ۱۵و۱ ±۱۱ بودند (شکل ۲ و جدول ۱).



شکل ۱. بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره مورد بر باکتری اشرشیا کلی ESBL به روش انتشار دیسک

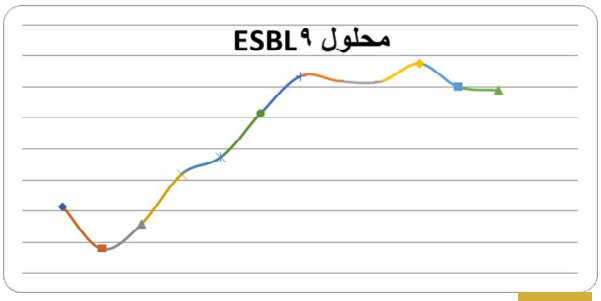
شکل ۲. بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره مورد بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) به روش انتشار دیسک

جدول ۱. قطر هاله ایجاد شده توسط غلظت‌های مختلف عصاره مورد در باکتری اشرشیاکلی ESBL و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) به روش انتشار دیسک

قطر هاله استافیلوکوکوس اورئوس MRSA	قطر هاله اشرشیاکلی ESBL	میکروگرم بر میلی‌لیتر
۱۵ ± ۲	۱۰ ± ۲	۱۰۰
۱۱ ± ۱	۱ ± ۸	۵۰
--	--	۲۵
--	--	۱۲/۵
--	--	۶/۲۵
--	--	۳/۱۲۵
--	--	۱/۵۶

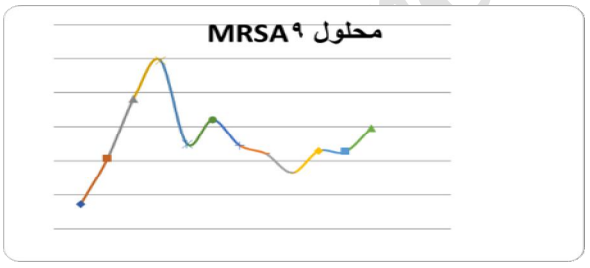
تعیین حساسیت میکروبی به روش کدورت سنجی

بررسی نتایج حاصل از روش کدورت سنجی برای اشرشیا کلی ESBL و رسم نمودار جذب نوری در برابر سریال رقت تعیین نمود که در غلظت ۱ عصاره گیاهی، جذب نوری بالایی وجود دارد. در ابتدا با کاهش غلظت عصاره به نصف مقدار جذب کمتر شده است، اما در رقت‌های بالاتر با کاهش غلظت عصاره میزان جذب نوری افزایش یافته است (نمودار ۱).



نمودار ۱. نمودار جذب نوری باکتری اشرشیاکلی ESBL در روش کدورت سنجی (شماره چاهک در برابر کدورت سنجی)

حداقل غلظت مهار رشد (MIC)، ۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی (MBC)۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای اشرشیا کلی ESBL تعیین شد. در نتایج حاصل از روش کدورت سنجی برای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین MRSA مشاهده گردید که در رقت‌های پایین عصاره میزان جذب نوری بالا بوده، اما در رقت‌های بعدی مقدار جذب کاهش یافته است (نمودار ۲). حداقل غلظت مهار رشد (MIC) ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی (MBC) ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای استافیلوکوکوس اورئوس MRSA تعیین شد.



نمودار ۲. نمودار جذب نوری باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین MRSA در روش کدورت سنجی(شماره چاهک در برابر کدورت سنجی)

۵. بحث

در این مطالعه اثرعصاره مورد بر روی دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) و

www.SID.ir

اشرشیا کلی ESBL، جدا شده از بیماران با دو روش کربی بائر و کدورت سنجی مقایسه گردید.

با توجه به نتایج روش کربی بائر، عصاره گیاه مورد دارای اثر مهار رشدی بر هر دو باکتری مقاوم به دارو بوده و قطر هاله در هر دو باکتری تقریبا مشابه ولی در استافیلوکوکوس اورئوس MRSA بیش از اثر بر اشرشیاکلی ESBL می‌باشد. مشاهده می‌گردد که با کاهش غلظت عصاره به ۱/۲ اثر آن کاهش یافته و سپس با افزایش رقت به ۱/۴ و بیشتر این اثر به طور کامل متوقف می‌شود. این کاهش و سپس توقف اثر را می‌توان به کاهش غلظت مواد موثره عصاره در اثر افزایش رقت آن نسبت داد.

روش انتشار دیسک وابسته به غلظت آگار، حلالیت عصاره در آب و نیز غلظت عصاره می‌باشد. از این رو، جهت ارزیابی اولیه باید استفاده شود.

در نمودار ۱ مربوط به جذب نوری برای اشرشیاکلی ESBL مشاهده می‌گردد که در کمترین رقت عصاره گیاهی به دلیل رنگی بودن عصاره، جذب نوری بالا بوده و دارای خطا است. با افزایش رقت عصاره به دو برابر مقدار این خطا کمتر شده و کدورت حاصل را می‌توان به رشد باکتری نسبت داد. نتایج نشان می دهند که با کاهش غلظت عصاره میزان رشد باکتری افزایش یافته است.

بررسی نتایج حاصل از روش کدورت سنجی برای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین MRSA در نمودار ۲ نشان می‌دهد که در این آزمون نیز در رقت‌های پایین عصاره (غلظت‌های بالای عصاره) میزان جذب نوری بالاست که این امر نه به دلیل رشد باکتری بلکه به علت رنگی بودن عصاره و خطای آزمون می‌باشد. در رقت‌های بعدی این خطا کاهش یافته و میزان جذب نوری کم می‌گردد. برای نمونه، شماره ۶ از غلظت ۵ به بعد و برای نمونه شماره ۹ از غلظت ۴ به بعد مجدداً جذب نوری افزایش می یابد که بیان‌گر بالا رفتن کدورت محلول در نتیجه رشد باکتری می‌باشد. از نظر تئوری نیز کاهش غلظت عصاره و بالطبع کاهش مواد موثره آن در محیط که بازدارنده رشد باکتری می باشند، منجر به افزایش رشد باکتری و در نهایت افزایش جذب نوری می-گردد که موید نتایج ارائه شده در نمودار ۲ است. این امر نشان‌دهنده ارتباط مستقیم بین غلظت عصاره و اثرضدباکتریایی آن است.

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان استنباط کرد که امکان استفاده از عصاره گیاه دارویی مورد به عنوان ماده ضدمیکروبی در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری اشرشیاکلی ESBL و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) وجود دارد. گیاه مورد فعالیت ضد میکروبی داشته و با توجه به مشکلات متعدد موجود در درمان عفونت‌های مختلف و از طرفی افزایش روزافزون مقاومت‌های آنتی بیوتیکی، می‌توان نتیجه گرفت که این گیاه و ترکیبات حاصل از آن می‌تواند برای مقاصد درمانی به کار گرفته شود.

در مطالعه ای که متوسل و همکاران به منظور بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آویشن شیرازی بر استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) به روش میکروبراث دایلوشن انجام دادند، مشخص شد که عصاره آویشن شیرازی اثر باکتریسیدال و ممانعت از رشد بر این باکتری دارد (۱۱).

در پژوهش دیگری که هوشمند و همکاران به منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف عصاره گیاه مورد علیه باکتری‌های حفره دهان به روش دیسک دیفیوژن انجام دادند، مشخص شد که عصاره این گیاه با غلظت‌های مختلف اثرات متفاوتی بر باکتری‌های تحت مطالعه دارد. بیشترین اثر عصاره مورد و بزرگترین قطر هاله مربوط به باکتری سودوموناس ائروژینوزا بود (۱۲).

داداش بیکی و همکاران در تحقیقی با عنوان بررسی اثر ضدباکتریایی گیاه ریحان بر اشرشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا نشان دادند که عصاره اتانولی و عصاره آبی به دست آمده از این گیاه بر هر دو باکتری گرم منفی مورد مطالعه موثر بوده، اما اثر عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی بیشتر بود (۱۳).

گیاه مورد به خصوص برگ‌های آن حاوی ترکیباتی نظیر ترپینولن، سینئول، لینالول، ترپینئول، لینالیل استات، تانن و

Archive of SID
www.SID.ir

فلاونوئید است. گزارش‌های متعددی از خواص ضدعفونی-کنندگی و ضدانگلی این گیاه ارائه شده است. تاکنون مطالعات متعددی روی خواص آنتی میکروبیال عصاره ساقه و برگ گیاه مورد علیه باکتری‌های بیماری‌زا انجام شده که روی اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، لاکتوباسیلوس پلنتاروم، لیستریا مونوسایتوژنز، سودوموناس ائروژینوزا، کلبسیلا و شیگلا نتایج خوبی حاصل شده است (۱۴).

نتایج بررسی اثرات ضدباکتریایی گیاه دارویی مورد در این مطالعه، تاثیر عصاره این گیاه را بر سوش‌های بیماری‌زای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) و اشرشیاکلی ESBL نشان می‌دهد.

در تحقیق دیگری اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی سیر (Allium sativum) از خانواده لیلیاسه بر سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک‌های مختلف به کمک روش رقت سازی در چاهک مورد بررسی قرار گرفت. طی این تحقیق مشخص گردید که این عصاره دارای بیشترین اثر مهاری بر استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد (۱۵).

با عنایت به این که مطالعات انجام شده در داخل و خارج از کشور روی آثار متعدد گیاه دارویی مورد از جمله اثرات ضدمیکروبی آن‌ها به خصوص بر میکروارگانیزم‌های گرم مثبت اجرا شده، طی تحقیق حاضر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) و اشرشیا کلی ESBL به عنوان دو باکتری بیماری‌زا مورد استفاده قرارگرفتند.

۶. نتیجه‌گیری

در این مطالعه، اثر ضد باکتریایی عصاره گیاه مورد نشان داد که این گیاه دارای اثر بازدارندگی بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی است. اثبات گردید که روش انتشار دیسک، محدوده غلظت را مشخص نموده و روش میکروپلیت با دقت، غلظت موثر را تعیین می‌نماید.

۷. تقدیر و تشکر

این مطالعه بدون حمایت مالی انجام گرفته است. بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی دانشگاه علوم پزشکی اراک و پرسنل محترم آن به جهت همکاری‌شان صمیمانه تشکر و سپاس‌گزاری می‌گردد.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Berahou A, Auhmani A, Fdil N, BenharrefA, Jana M, Gadhi C A. Antibacterial activity ofquercus ilex bark's extracts. J Ethnopharmacol. 2007; 112(3): 426-429.
2. Sripathi R, Jayagopal D, Ravi S. A study on the seasonal variation of the essential oil composition from Plectranthus hadiensis and its antibacterial activity. Nat Prod Res. 2018; 32(7):871-874.
3. Barac A, Donadu M, Usai D, Spiric VT, Mazzarello V, Antifungal activity of Myrtus communis against Malassezia sp. isolated from the skin of patients with pityriasis versicolor. Infection. 2017; Nov 20. doi: 10.1007/s15010-017-1102-4.
4. Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A and et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic Staphylococcusaureus isolated from meat and dairy products. Int J Food Microbiol. 2007; 115:290-296.
5. SoltanDallal MM, Salehipour Z, Eshraghi S, FallahMehrabadi J, Bakhtiari R. Occurrenceand molecular characterization of Staphylococcus aureus strains isolated from meat and dairyproducts by PCR-RFLP. Ann Microbiol. 2010; 60:189–196.
6. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMCComplementary and Alternative Medicine. 2006; 6(39):1-8.
7. Samsamshariat H. Medical plants. 1st ed. Isfahan: chaharbagh. 2006; 10. [In Persian]
8. Faid M, Bakhy K, Anchad M, Tantaoui-Elaraki A. Almond paste: physicochemical and microbiological characterization and preservation with sorbic acid and cinnamon. Journal ofFood Protection. 1995 ;58(5):547-50.
9. Zargari A. Plant Medical.University of Tehran Press. 1989; 645-7.
10. Aridogan BC, Bydar H, Kava S, Demirci M, Ozbasar D, Mumcu E. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. Arch Pharm Res. 2002; 25(6). 860-4.
11. Anwar S, Crouch RA, Awadh Ali NA, Al-Fatimi MA, Hierarchical cluster analysis and chemical characterisation of Myrtus communis L. essential oil from Yemen region and its antimicrobial, antioxidant and anti-colorectal adenocarcinoma properties. Nat Prod Res. 2017; 31(18):2158-2163.
12. Mansouri Taee H, Hajimoradloo A, Hoseinifar SH, Ahmadvand H. Dietary Myrtle (Myrtus communis L.) improved non-specific immune parameters and bactericidal activity of skin mucus in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fingerlings. Fish Shellfish Immunol. 2017; 64:320-324.
13. Dadashbeygi M, V Rezakhani, pearl Pshdar, A. Darabi, Lyrzamsrvr. The effect on E. coli and Pseudomonas aeruginosa antibacterial basil. Islamic Azad University Veterinary Journal, Volume 4, Issue 4, 2010; 4(4):71-80.
14. Taheri A, Amir Safian, Samira Jalali race, Fatima Nasser. Antibacterial Effect of Myrtus Communis Hydro-Alcoholic Extract on Pathogenic. Bacteria. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2013; 15(6): 19-24.
15. Bkaian M, R Farazmand, S. Keyghobad, S. Said. The antibacterial effect of ethanol extract of garlic (Allium Sativum) on Staphylococcus aureus strains resistant to different antibiotics. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology). 2015; 28(1):34-41.

Archive of SID

www.SID.ir

JAMS
Journal of Arak University of Medical Sciences
2018; 21(3)
Journal Homepage: http://jams.arakmu.ac.ir

ORIGINAL RESEARCH

Comparison of Disk Diffusion and Micro-Dilution Broth Methods for Evaluation of Antimicrobial Effects of *Myrtus* Extract on Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli* ESBL

Maryam Sadrnia[1*], Ghasem Habibi[2], Mohammad Arjomandzadegan[3]

1. Department of Biology, Payame Noor University, Tehran. Iran.
2. Infectious Disease Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
3. Infectious Disease Research Center, Department of Microbiology and Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history:
Received: *26 December 2017*
Accepted: *09 May 2018*
Published online: *22 May 2018*

Keywords:
Disk diffusion
Ecoli ESBL
Micro-dilution Broth
MRSA
Myrtus extract

**** Corresponding Author:***
Maryam Sadrnia; Department of Biology, Payame Noor University, Tehran. Iran.
Tel: *+98 918 860 8302*
Fax:
Email: *msadrnia@yahoo.com*

ABSTRACT

Background and Aim: In this study, the effect of *Myrtus* extracts on 25 methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and *Escherichia coli* ESBL strains isolated from patients were compared by two methods.

Materials and Methods: 15 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and 10 *Escherichia coli* ESBL isolates were used in this study. Fresh Leaves of Myrtus were collected from the herbal medicine farm. Extraction was performed using a reflux distillation. The effect of concentrations 0.195-100 micrograms per ml of *Myrtus* extract on clinical isolates was analyzed in disk diffusion method compared with micro broth dilution method and with MTT in 545 nm on an ELISA reader apparatus.

Findings: Inhibition zone diameter for the minimum effective concentration of 50 micrograms per milliliter in all isolates of ESBL and MRSA were as 8±1 mm and 11±1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was 6.25mic/ml and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was determined 12.5mic/ml for *E. coli* ESBL. Furthermore, the amounts for MIC and MBC was determined as 12.5 and 25 mic/ml, respectively for *Staphylococcus aureus*.

Conclusion: The results of this study showed compliance of two methods in evaluation of drug-resistant clinical isolates. It was proved that the disk diffusion method could be determining range of effective concentration but micro broth method determines the effective concentration carefully. It is recommended that results obtained from disk diffusion not to be basis for final decisions in traditional medicine studies. Bacterial behavior in the broth and determination of the point of death greatly increases the accuracy of the results.

© Copyright (2018) Arak University of Medical Sciences

Cite this article as: Sadrnia M., Habibi GH., Arjomandzadegan M. Comparison of Disk Diffusion and Micro-Dilution Broth Methods for Evaluation of Antimicrobial Effects of Myrtus Extract on Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus and Escherichia Coli ESBL. J Arak Uni Med Sci. 2018; 21(3): 75-82.

This open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).

www.SID.ir