



مقاله پژوهشی

اثر ضد میکروبی عصاره‌های اکالیپتوس و ازگیل بر کلبسیلا پنومونیه جداسده از عفونت‌های ادراری در بیمارستان‌های رشت

مریم باسبوس، لیلا اسدپور، حورا پورغفار*

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، رشت، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۴/۲۳

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۲/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: کلبسیلا پنومونیه، پاتوژن فرصت‌طلب در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی است. امروزه استفاده از داروهای با منشأ گیاهی، بر ضد باکتری‌های با مقاومت دارویی اهمیت ویژه‌ای یافته است. هدف از مطالعه حاضر تعیین میزان فراوانی کلبسیلا پنومونیه‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف در جدایه‌های بالینی شهر رشت و بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های اکالیپتوس و ازگیل بر این باکتری‌ها است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تعداد ۴۵ جدایه کلبسیلا پنومونیه از عفونت‌های ادراری جدا شدند. تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز در این جدایه‌ها به ترتیب از روش دابل دیسک دیفیوژن و دیسک دیفیوژن بررسی شد. وجود ژن‌های TEM و SHV با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به روش PCR مورد بررسی قرار گرفت، سپس اثر ضد میکروبی عصاره برگ اکالیپتوس و ازگیل بر باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتاماز به روش انتشار از چاهک و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌ها به روش برات ماکرودایلوژن بررسی گردید.

نتایج: ۲۶ جدایه از ۴۵ مورد کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده، مولد بتالاکتاماز بودند. پس از انجام PCR (۵۳٪) دارای ژن‌های TEM و SHV بودند که در این میان به ترتیب ۴۲٪ و ۱۱٪ جدایه ژن‌های TEM و SHV مثبت بودند. MIC عصاره‌های آبی و اتانولی اکالیپتوس و ازگیل به ترتیب بین ۳۱-۱۷/۵ و ۲۵۰-۱۶۵ میلی گرم بر میکرولیتر و MBC به ترتیب بین ۱۶۵-۲۵۰ و ۶۰۰-۱۰۰۰ میلی گرم بر میکرولیتر است.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد، عصاره‌های گیاهی اکالیپتوس و ازگیل بر ضد باکتری‌های مقاوم، خواص ضد میکروبی دارند و می‌تواند به‌عنوان یک رهیافت در درمان عفونت‌های کلبسیلایی بخصوص در درمان عفونت‌های ادراری مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، بتالاکتاماز وسیع الطیف، اکالیپتوس، ازگیل، TEM، SHV

مقدمه

۰/۶ میکرومتر است و اغلب تشکیل کلنی‌های موکوئیدی می‌دهند (۲).

کلبسیلا پنومونیه دارای آنتی‌ژن‌های O، K، کپسول و پیلی است، همچنین دارای سیدوفورهای فنولات مانند انتروباکتین و هیدروگزیمات مانند آئروباکتین است (۳). مهم‌ترین توکسین‌های آن اندوتوکسین و انتروتوکسین‌های حساس و پایدار به حرارت است که بر روی پلاسمیدها کدگذاری می‌شود، بررسی‌ها نشان می‌دهند که یک همبستگی بین تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی، لیپوپلی‌ساکارید و پلی‌ساکارید کپسولی و حدت باکتری‌های

کلبسیلاها پاتوژن‌های فرصت‌طلبی هستند که در همه جای طبیعت به‌ویژه در سطح آب، فاضلاب، خاک و گیاهان و سطوح غشای مخاطی پستانداران از جمله انسان و اسب یافت می‌شوند (۱). این باکتری‌های گرم منفی، میله‌ای شکل، غیر متحرک، بدون اسپور، بی‌هوازی اختیاری، دارای کپسول پلی‌ساکاریدی، ضخیم متعلق به خانواده *نتروباکتریاسه* که اندازه آن‌ها ۰/۳ تا

*نویسنده مسئول: حورا پورغفار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، رشت، ایران
G-mail: Houraghafari@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-4443-2414

آن تأکید دارد. گیاهان دارویی به‌عنوان یک منبع بالقوه، مواد ضد میکروبی متنوعی دارند و دارای اثر سمی کم و یا فاقد اثر سمی هستند و بروز مقاومت نسبت به آن‌ها گزارش نشده است (۹).

گیاه اکالیپتوس گلوبوس بانام علمی *Eucalytus glubulus* متعلق به خانواده *Myrtaceae* از گیاهان بومی استرالیا و تاسمانی است و یکی از معروف‌ترین گیاهان دارویی است که از دیرباز اثرات ضد میکروبی آن مورد توجه بوده است. اکالیپتوس درختی با ارتفاع حدود ۱۰۰ متر سخت و بادوام، با سازش بالا نسبت به شرایط محیطی است، اما مهم‌ترین عامل محدودکننده رشد این گیاه دمای پایین است، به همین دلیل در نواحی محدودی از استرالیا که بارش برف در آنجا زیاد است، اکالیپتوس رشد نمی‌کند (۱۰). این گیاه منبع غنی از پلی‌فنل‌ها و ترپنوئیدها است و ترکیب اصلی برگ آن ۱ و ۸ سینئول (%۵۰ تا %۸۰) به فرمول $C_{10}H_{18}O$ است که به نام‌های اکالیپتول و کاژه بوتول نیز گفته می‌شود، شبیه کافور است که از طریق عصاره‌گیری به دست می‌آید. عصاره اکالیپتوس حاوی Tannins, Saponins, Cardiac Glycosides، آلفا پنین، آلدئیدهای فرار و سزکویی ترپن‌ها با خواص دارویی است که در پزشکی کاربرد دارند (۱۱). درخت ازگیل بانام علمی *Mespilus germanica* است، میوه‌ای از خانواده گل‌سرخیان که از حدود سه هزار سال پیش تاکنون به‌طور خودرو در جنوب دریای خزر و در مناطق گیلان و مازندران می‌روید. حدود ۲-۳ متر رشد می‌کند. میوه ازگیل سرشار از قند، آمینواسید، اسیدهای آلی و تانن است. فروکتوز، گلوکز و ساکاروز به‌عنوان قندهای اصلی موجود در این میوه تشخیص داده شده‌اند که مقدار آن‌ها در طی مراحل مختلف رسیدن میوه متغیر است. اسیدهای چرب اصلی موجود در مزوکارپ میوه ازگیل شامل پالمیتیک اسید، آلفا لینولنیک اسید و لینولنیک اسید می‌باشند، اما مقادیری اولئیک اسید و استئاریک اسید نیز در آن وجود دارد. اسیدهای آلی موجود در میوه ازگیل به‌طور عمده از نوع اسید مالیک، اسید سیتریک و اسید تارتاریک می‌باشند. از جمله ویتامین‌های موجود در این میوه می‌توان به ویتامین ث و گروه ب اشاره کرد (۱۲).

امروزه انجام مطالعه بر روی اثر ضد میکروبی عصاره‌های برگ اکالیپتوس و ازگیل بر کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع الطیف مورد بررسی قرار می‌گیرد. اکالیپتوس یکی از معروف‌ترین گیاهان دارویی است که اثر ضد میکروبی آن از دیرباز

تولیدکننده وجود دارد (۴). این باکتری موجب سپتی‌سمی، باکتری‌می، پنومونی، آنتریت نوزادان، مننژیت، عفونت‌های دستگاه ادراری و بافت‌های نرم می‌شوند. از سال ۱۹۸۴ کلبسیلا پنومونیه به‌عنوان عامل عفونت‌های اکتسابی بیمارستانی و حامل مقاومت‌های چندگانه شناخته شده است (۵).

مجموعه داروهای بتالاکتام، فراوان‌ترین و پرمصرف‌ترین داروهای تجویزی علیه میکروارگانیسم‌ها هستند. یکی از مکانیسم‌های مهم پیدایش مقاومت نسبت به داروهای بتالاکتام، تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف (Extended Spectrum B-Lactamase) است که این آنزیم‌ها با هیدرولیز حلقه بتالاکتام در ساختار این داروها مانع از فعالیت ضد میکروبی آن‌ها شده و منجر به ایجاد مقاومت میکروارگانیسم‌ها به داروهای بتالاکتام وسیع الطیف می‌شود (۶). عفونت باکتری‌های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف در انتشار وسیع این سویه‌ها به‌ویژه در بیمارستان‌ها باعث افزایش هزینه درمان و افزایش طول مدت بستری می‌گردد و امروزه وجود انتروباکتریاسه مولد ESBL یک نگرانی بزرگ و در حال گسترش در دنیا محسوب می‌شود. بتالاکتامازهای وسیع الطیف اغلب پلاسمیدی هستند و از آنجایی که پلاسمیدها به‌راحتی در میان انواع مختلفی از انتروباکتریاسه انتقال می‌یابند، تجمع ژن‌های مقاومت منجر به ایجاد سویه‌های پلاسمیدی با مقاومت چندگانه می‌شود و شیوع عفونت‌های بیمارستانی ناشی از کلبسیلا پنومونیه با واسطه پلاسمیدها خود انتقال‌دهنده‌ای است که بتالاکتامازهای وسیع الطیف مشتق از ژن‌های TEM و SHV است که روی پلاسمیدهای بزرگی حمل می‌شوند و اغلب همراه با سایر شاخص‌های مقاومت به سویه‌های مختلفی از یک جنس یا سایر جنس‌های انتروباکتریاسه انتقال می‌یابند (۷). در سال‌های اخیر افزایش میزان جداسازی سویه‌های مولد این آنزیم‌ها از نقاط مختلف جهان گزارش شده است. این باکتری به دلیل اکتساب پلاسمیدهایی که بتالاکتامازهای وسیع الطیف و آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی را رمز می‌کنند به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله سفالوسپورین‌های وسیع الطیف و آمینوگلیکوزیدها مقاوم‌اند. بدین ترتیب احتمال درمان عفونت‌های کلبسیلائی توسط این آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار ضعیف شده و ضرورت دستیابی به مواد ضد میکروبی جدید را ایجاب می‌کند (۸).

سازمان بهداشت جهانی به‌طور مکرر بر رویکرد جامع به طب سنتی و گیاهان دارویی و نیز ضرورت کاربرد علمی و اقتصادی

عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد. در صورتی که اختلاف قطر هاله اطراف دیسک‌های ترکیبی (حاوی کلاونیک اسید) نسبت به دیسک تنها (فاقد کلاونیک اسید) بیشتر یا مساوی ۵ میلی‌متر بود، جدایه موردنظر به‌عنوان فنوتیپ ESBL مثبت در نظر گرفته شد. در این مطالعه از سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه ATCC33591 به‌عنوان کنترل مثبت و دیسک Blank عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱۶).

استخراج DNA: برای استخراج DNA از کیت استخراج DNA (High pure PCR Template Preparation kit) ساخت شرکت سینا ژن استفاده شد و مراحل استخراج DNA بر اساس دستورالعمل کیت صورت گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR-Multiplex): به‌منظور تکثیر ژن‌های TEM (861pb) و SHV (471pb) و از پرایمرهای اختصاصی با توالی زیر استفاده گردید (۱۷) (جدول ۱).

جدول ۱- پرایمرهای اختصاصی به‌منظور تکثیر ژن‌های TEM و SHV

TEM-F	5'GAGTATCAACATTTCCGTGTC 3'
R	5'TAATCAGTGAGGCACCTATCTC 3'
SHV-F	5'TCAGCGAAAAACACCTTG 3'
R	5'CCCGCAGATAAATCACCA 3'

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۰/۵ میکرولیتر بافر (25mM) $MgCl_2$ ، ۱ میکرولیتر dNTPs (10mM)، ۱/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (10pmol)، ۱ میکرولیتر آنزیم Taq DNA پلی‌مراز (۵U/ μ l) و ۱/۵ میکرولیتر DNA الگو انجام شد.

واکنش PCR با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و درنهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

در این مطالعه برگ‌های تازه گیاه اکالیپتوس و ازگیل در مهرماه ۱۳۹۷ از رویشگاه‌های حوالی شهرستان فومن جمع‌آوری شد. پس از تأیید، جهت تهیه عصاره (آبی و اتانولی) از روش خیساندن

موردتوجه بوده است و عصاره برگ آن بر روی طیف وسیعی از باکتری‌ها مانند، کلبسیلا، پرسیپیا، سالمونلا، باسیلوس و قارچ‌ها اثر ضد میکروبی از خود نشان داده است (۱۳).

اثر ضد میکروبی به فراوانی در جنگل‌های گیلان وجود داشته و به‌آسانی در دسترس هستند، در صورتی که وجود خواص ضد میکروبی آن‌ها بر ضد باکتری‌های مقاوم به داروهای نسل جدید با طیف اثر وسیع ثابت گردد، می‌تواند به‌عنوان یک رهیافت جدید در درمان عفونت‌های کلبسیلائی به‌خصوص درمان موضعی عفونت‌های ادراری استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی میکروبی سویه‌ها: در این مطالعه، از تیر تا بهمن ۱۳۹۷ با تأییدیه کمیته اخلاق پژوهش و رضایت‌نامه کتبی از بیماران، تعداد ۲۶۹ نمونه ادراری بالینی از مراکز تشخیصی-درمانی مختلف (بیمارستان‌های رازی، پورسینا و قائم) شهر رشت جمع‌آوری گردید. شناسایی فنوتیپی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به‌وسیله رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های اکسیداز، کاتالاز، اوره آز و تست‌های بیوشیمیایی سیترات، تحرک و تولید اندول، MR/VP و TSI و کشت روی محیط مک‌کانکی و SIM آگار (مرک، آلمان) صورت گرفت (۱۴).

ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی و شناسایی جدایه‌های ESBL با روش فنوتیپی: انجام آزمایش حساسیت (آنتی‌بیوگرام) با استفاده از روش Kirby Bauer و طبق دستورالعمل انستیتو استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) Clinical and laboratory standards institute با استفاده از روش Disk Diffusion بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (Muller Hinton Agar) انجام شد (۱۵). از سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند جدایه‌ها بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد، سپس، حساسیت سویه‌های کلبسیلا پنومونیه نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (شرکت پادتن طب) سفی‌پیم (30 μ g)، سفیکسیم (5 μ g)، سفنازیدیم (30 μ g)، سفریاکسون (30 μ g)، سفوتاکسیم (30 μ g)، کلاونیک‌اسید (10 μ g) و همچنین دو دیسک ترکیبی با کلاونیک‌اسید (سفنازیدیم/کلاونیک‌اسید، سفوتاکسیم/کلاونیک‌اسید) به‌منظور شناسایی نمونه‌های ESBL، بافاصله ۲۰ میلی‌متر بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) قرار گرفت. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته پلیت‌ها در ۳۷ درجه سلسیوس، قطر هاله

نتایج

جداسازی و تشخیص نمونه‌های بالینی: در این مطالعه در مجموع ۲۶۹ نمونه ادرار، از آزمایشگاه‌ها و بیمارستان‌های شهر رشت جمع‌آوری شد. ۴۵ جدایه از باکتری‌های میله‌ای گرم منفی، غیر متحرک با کلنی‌های موکونیدی و تخمیرکننده لاکتوز در محیط مک‌کانکی، MR منفی، VP مثبت، اندول و SH2 منفی باقابلیت تولید آنزیم‌های کاتالاز، اوره‌آز و سیتراز به‌عنوان کلبسیلا پنومونیه شناسایی و مورد مطالعه قرار گرفت.

ارزیابی حساسیت میکروبی و نتایج غربالگری گونه‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (EBLS) به روش دوبل دیسک دیفوزن: ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش آنتی‌بیوگرام، از ۴۵ جدایه کلبسیلا پنومونیه نشان داد که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفریاکسون ۲۶/۶۶ درصد، مشاهده شد و بیشترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفی‌پیم ۶۶/۶۶ درصد گزارش گردید و در مجموع ۲۶ جدایه (۵۷/۷۷ درصد) تولیدکننده EBLS، با روش دوبل دیسک دیفوزن جداسازی گردید (جدول ۲).

استفاده شد، به این صورت که گیاهان پودر شده و ۵۰ گرم از هر گیاه به مدت ۴۸ ساعت در ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد خیسانده شد و پس از آن با کاغذ صافی و قیف، صاف گشت. عصاره‌های به‌دست‌آمده با استفاده از دستگاه تقطیر در دمای ۴۰ درجه سلسیوس تغلیظ شدند و سپس، روی بن ماری با دمای ۴۵ درجه سلسیوس، حلال حذف گردید. در نهایت عصاره‌های با غلظت یک گرم بر میلی‌لیتر تهیه گردیدند که با استفاده از فیلترهای میکروبی ۰/۴۵ میکرونی استریل شدند. به‌منظور تعیین MIC و MBC عصاره‌ها، با روش انتشار چاهکی در آگار، بر روی محیط مولر هینتون آگار و استفاده از کشت باکتری، از سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند و ۰/۵ میلی‌گرم از هر عصاره، با غلظت‌های متفاوت استفاده شد و کمترین رقت از عصاره‌ها که هاله عدم رشد داشتند، به‌عنوان MIC و یک چاهک قبل‌تر به‌عنوان متوقف‌کننده رشد MBC محاسبه گردید، به روش ماکرادیلوشن در لوله‌های مورد آزمایش تکرار و سپس سه بار با کشت بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار تأیید شدند (۱۸).

تجزیه و تحلیل آماری: برای این منظور از تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آمار توصیفی (تعداد، درصد و نمودار) و آمار

جدول ۲- ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در ۴۵ جدایه کلبسیلا پنومونیه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های CLSI

آنتی‌بیوتیک	مقاوم		نیمه حساس		حساس	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
سفی‌پیم	۶	(۱۳/۳۳)	۹	(۲۰)	۳۰	(۶۶/۶۶)
سفیکسیم	۱۰	(۲۲/۲۲)	۹	(۲۰)	۲۶	(۵۷/۷۷)
سفتازیدیم	۱۱	(۲۴/۴۴)	۱۰	(۲۲/۲۲)	۲۴	(۵۳/۳۳)
سفریاکسون	۱۲	(۲۶/۶۶)	۹	(۲۰)	۲۵	(۵۵/۵۵)
سفوتاکسیم	۱۰	(۲۲/۲۲)	۱۰	(۲۲/۲۲)	۲۵	(۵۵/۵۵)
سفتازیدیم + کلاونیک اسید	۳	(۶/۶۶)	۲۸	(۶۲/۲۲)	۱۴	(۳۱/۱۱)
سفوتاکسیم + کلاونیک اسید	۳	(۶/۶۶)	۳۰	(۶۶/۶۶)	۱۲	(۲۶/۶۶)

نتایج PCR برای تشخیص حضور ژن‌های TEM و SHV: جهت تعیین حضور ژن‌های مذکور آزمون PCR بر روی ژنوم

استنباطی (آزمون کای دو) به کمک نرم‌افزار SPSS استفاده شد و $P < ۰/۰۵$ از نظر آماری با معنادار در نظر گرفته شد.

۲۲/۷۰ (اتانولی اکالیپتوس)، ۱۹/۳۵ (آبی ازگیل) و ۱۷/۴۱ (اتانولی ازگیل) میلی متر بوده است.

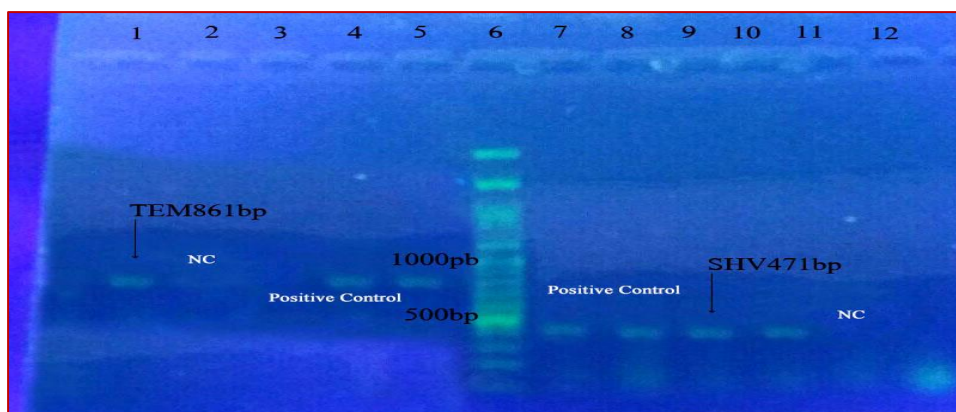
نتایج بررسی MIC و MBC عصاره‌ها به روش براث ماکرودایلوشن:

بیشترین، حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) در عصاره‌های آبی و اتانولی مربوط به

استخراج شده کلیه جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه انجام شد. از ۲۶ جدایه این باکتری در مجموع ۲۴ جدایه (۵۳٪) حامل ژن‌های TEM و SHV بوده که از این میان ۵ جدایه (۱۱٪) ژن TEM مثبت، ۱۹ جدایه (۴۲٪) ژن SHV، ۵ جدایه (۱۱٪) نیز از نظر حضور هم‌زمان هر دو ژن مثبت بودند (تصویر الکتروفورز محصول PCR ژن‌های TEM و SHV در شکل ۱ آمده است).

جدول ۳- میانگین MIC و MBC عصاره‌های آبی و اتانولی اکالیپتوس و ازگیل در نمونه‌ها

ازگیل		اکالیپتوس		انواع عصاره‌ها
MBC	MIC	MBC	MIC	(میلی گرم بر میکرولیتر)
۶۰۰	۱۶۵	۳۵۰	۱۷/۵	آبی
۱۰۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۳۱	اتانولی



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR-Multiplex حاصل از تکثیر ژن TEM و SHV بر روی ژل آگارز. نمونه حاوی ژن TEM (861bp) در ستون شماره ۱. نمونه حاوی ژن SHV (471bp) در ستون‌های ۹ و ۱۰. NTC کنترل منفی در ستون‌های ۲ و ۱۲ و ستون‌های ۳ و ۷ کنترل مثبت (کلبسیلا پنومونیه ATCC33591). Ladder 100 bp جفت

گیاه ازگیل بوده است (جدول ۳).

بحث و نتیجه‌گیری

کلبسیلا پنومونیه، پاتوژن فرصت‌طلب و دخیل در عفونت‌های دستگاه ادراری و عفونت‌های مرتبط با سوند بیماران بستری و افراد در معرض خطر هستند. عفونت‌های دستگاه ادراری، یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در سنین مختلف است. مهم‌ترین عامل عفونت مجرای ادراری در دنیا بعد از /شرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه است. این باکتری در ۱۶ تا ۱۷ درصد از عفونت‌های ادراری بیمارستانی نقش دارد. به دلیل استفاده، وسیع و نادرست

نتایج بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره‌ها به روش انتشار چاهکی در آگار: اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی اکالیپتوس و ازگیل بر ۲۶ جدایه، کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع طیف، به روش انتشار چاهک مورد بررسی قرار گرفت. همه جدایه‌ها به عصاره‌های گیاهان مورد مطالعه حساس بوده‌اند و از نظر قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در جدایه‌های حساس و مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P < 0/05$).

متوسط قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط عصاره آبی و اتانولی اکالیپتوس و ازگیل به ترتیب ۲۱/۰۵ (آبی اکالیپتوس)،

بتالاکتاماز در جدایه‌های کلبسیلا است و ۷۳-۱۱٪ جدایه‌ها، این آنزیم را دارند. بتالاکتاماز TEM در بسیاری از جدایه‌های دیگر کلبسیلا، به‌تنهایی یا همراه با SHV انتشار یافته است (۲۱). امروزه وجود بتالاکتامازهای وسیع الطیف در باکتری‌ها یک معضل مهم بهداشتی در اکثر کشورها محسوب می‌گردد، به‌طوری‌که پس از کشف اولین بتالاکتاماز در اروپا، در حال حاضر گزارش‌ها مبنی بر فراگیر شدن آن در سراسر دنیا ارائه می‌گردد (۲۲).

در مطالعه که توسط ترشیزی و همکاران (۲۰۱۰) در شهرکرد صورت گرفت، ۲۰/۲ درصد سویه‌های کلبسیلا پنومونیه دارای آنزیم ESBL بودند (۲۳). غفوریان و همکاران (۲۰۱۱) میزان فراوانی، کلبسیلا پنومونیه مولد ESBL جدا شده از عفونت‌های دستگاه تنفسی در بیمارستان‌های سه شهر ایران را ۵۹/۲ درصد، اعلام نمود که بسیار به نتایج این مطالعه با ۵۷/۷۷ درصد، نزدیک است (۲۴). مطالعه مشابه دیگری که توسط پیمانی و همکاران (۲۰۱۲) در قزوین انجام پذیرفت، ۹/۷۸ درصد جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه دارای ESBL بودند (۲۵). در مطالعه‌ای دیگری که توسط لشکری و همکاران، در بیمارستان‌های بعثت و امام رضا تهران (۲۰۱۳) صورت گرفت که از ۱۰۰ جدایه کلبسیلا پنومونیه تفکیک شده از عفونت‌های دستگاه ادراری، ۲۶ درصد دارای ESBL بودند (۲۶). اکبری و همکاران (۲۰۱۳) از بین ۴۰۰ پاتوژن جدا شده از نمونه‌های ادراری از بیمارستان امام خمینی اردبیل با استفاده از آزمون تأییدی دیسک ترکیبی برای تولید ESBL، ۳۶/۷۵ درصد را مولد آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف گزارش نمودند و به‌طور خاص میزان شیوع برای گونه کلبسیلا پنومونیه ۱۰/۲ درصد تعیین گردید، در نتیجه نسبت به این پژوهش کمتر است که می‌تواند نشانه افزایش جدایه‌های مولد این آنزیم باشد (۲۷). عسگری و همکاران (۲۰۱۴)، طی پژوهشی به‌منظور بررسی شیوع جدایه‌های کلبسیلا مولد بتالاکتاماز در شهر کرج، ۲۵ درصد از جدایه‌ها را به‌عنوان نمونه‌های مولد ESBL گزارش کردند که از این تعداد ۹۲ درصد، کلبسیلا پنومونیه و ۸ درصد، کلبسیلا/کسی توکا بودند (۲۸). کریمی و همکاران (۲۰۱۷)، در مطالعه‌ای شیوع جدایه‌های کلبسیلا مولد بتالاکتاماز را ۲۲ درصد گزارش دادند (۲۹). در مطالعه حاضر ۵۷/۷۷ درصد نمونه‌های مولد ESBL مشاهده شد که نسبت به مطالعات دیگر بیشتر است. میزان حساسیت به نمونه‌های مولد ESBL نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ترکیبی، سفتازیدیم و سفوتاکسیم همراه با کلونیک اسید به ترتیب ۹۶ و ۸۸ درصد و

از آنتی‌بیوتیک‌ها طی دو دهه اخیر، باکتری‌ها مقاوم به درمان شده و افزایش آمار مرگ‌ومیر ناشی از آن‌ها مورد توجه قرار گرفته است. 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 (۲).

اگرچه 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 کلبسیلائی در مقایسه با عفونت /شرشیاکلی کمتر و در نتیجه گردآوری تعداد قابل‌بررسی زمان‌بر بود. مهم‌ترین مکانیسم مقاومت علیه عوامل ضد میکروبی در باکتری‌های گرم منفی مهم، هیدرولیز آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام توسط آنزیم‌های بتالاکتام است. در این تحقیق سعی شده گام‌هایی در جهت اثبات اثرات ضد میکروبی دو گیاه بومی منطقه گیلان، موسوم به اکالیپتوس و ازگیل بر روی کلبسیلا پنومونیه مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف برداشته شود.

ژن‌های این آنزیم‌ها اغلب به‌صورت پلاسمیدی و گاهی به‌صورت کوروموزومی هستند و از آنجائی که پلاسمیدها به‌راحتی در میان انواع مختلفی از /تروپاکتریاسه‌ها انتقال می‌یابند، تجمع ژن‌های مقاومت، منجر به ایجاد سویه‌های با مقاومت چندگانه می‌شوند؛ بنابراین تعیین الگوی این سویه‌ها ضروری است، چراکه در بررسی‌های اپیدمیولوژیک درمان مناسب کنترل و پیشگیری عفونت‌های بومی و همه‌گیر، ناشی از کلبسیلا از اهمیت بسزایی برخوردار است (۶).

این پدیده محدود به مناطق خاصی نیست و گسترش آن یک خطر جدی در مناطق آسیایی، اروپایی، آمریکای جنوبی و آفریقایی بشمار می‌آید. شیوع واقعی ESBL‌ها در کشورهای مختلف و حتی در مناطق مختلف یک کشور تفاوت‌های قابل‌ملاحظه‌ای با یکدیگر دارد (۱۹). شیوع عفونت‌های بیمارستانی ناشی از کلبسیلا پنومونیه با واسطه پلاسمیدهای خود انتقال‌دهنده‌ای است که ژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف را رمز می‌کنند. شایع‌ترین ژن‌های مربوط به ESBL‌های گزارش شده، از کشورهای غربی و آسیایی دو ژن TEM و SHV است. TEM و SHV آنزیم‌هایی تولید می‌کنند که توسط اغلب /تروپاکتریاسه‌ها و بیشتر، /شرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه تولید می‌شوند (۲۰). بررسی‌ها نشان می‌دهند که SHV شایع‌ترین



از نظر حضور هم‌زمان هر دو ژن مثبت بودند. با توجه به شیوع گسترده مقاومت دارویی، استفاده از گیاهان به‌عنوان مخازن طبیعی عوامل ضد میکروبی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. مطالعه حاضر نیز با هدف دستیابی به عوامل ضد میکروبی مؤثر بر کلسیلاهای تولیدکننده بتالاکتامازهای طیف وسیع به بررسی اثر ضد میکروبی عصاره اکالیپتوس و ازگیل بر این باکتری‌ها پرداخته است. در مطالعه ما همه جدایه‌ها به عصاره‌های گیاهان مورد مطالعه حساس بوده‌اند و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره‌های آبی و اتانولی اکالیپتوس و ازگیل به ترتیب بین ۳۱-۱۷/۵ میلی‌گرم بر میکرولیتر و ۲۵۰-۱۶۵ میلی‌گرم بر میکرولیتر است و همچنین حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های آبی و اتانولی اکالیپتوس و ازگیل به ترتیب بین ۱۶۵-۲۵۰ میلی‌گرم بر میکرولیتر و ۱۰۰۰-۶۰۰ میلی‌گرم بر میکرولیتر است، در مطالعات گذشته نیز عصاره گیاهان اکالیپتوس و ازگیل به‌عنوان یک عصاره دارای خواص ضد میکروبی معرفی گردیده است. Osawa و همکاران (۲۰۰۰) طی مطالعه‌ای در ژاپن نشان دادند که برخی از ترکیبات به‌دست آمده از برگ‌های *E. gloulus* دارای فعالیت ضد میکروبی با حداقل غلظت ممانعت از رشد باکتری ۶/۲۵ میلی‌گرم در میکرولیتر بر باکتری‌های بیماری‌زایی روده‌ای است (۳۶).

Pattnaik و همکاران (۲۰۰۵) در مرکز تحقیقات پزشکی منطقه‌ای هند فعالیت ضد میکروبی اسانس اکالیپتوس را برای ۱۲ جدایه باکتری‌های میله‌ای گرم منفی و باکتری‌های میله‌ای گرم مثبت و ۱۰ جدایه قارچ با حداقل غلظت ممانعت از رشد باکتری به ترتیب ۲۰-۱۶/۰ و ۱۰-۰/۲۵ میلی‌لیتر در میکرولیتر گزارش نمودند (۳۷). Srinivasan و همکاران (۲۰۰۶) قطر هاله بازدارنده از رشد عصاره اکالیپتوس را برای باکتری *سودوموناس آئروژینزا* ۳۲ میلی‌لیتر گزارش و آن را به‌عنوان یک ماده ضد باکتری مناسب معرفی کردند (۳۸). در یک مطالعه تأثیر اسانس اکالیپتوس در برابر میکروارگانیسم‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که قطر هاله بازدارنده نسبت به شاهد بسیار قابل ملاحظه بود، به‌طوری‌که این هاله در سوبه‌های *استرپتوکوکوس پایوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب مقدار ۵۱-۲۵ و ۴۸-۲۲ میلی‌متر و در سوبه‌های *شرشیاکلی* ۴۷-۲۳ میلی‌متر مشاهده شد (۳۹). در مطالعه دیگری اثر بازدارندگی عصاره متانولی اکالیپتوس روی *سودوموناس آئروژینزا* ۱۵ میلی‌متر گزارش شده است (۲۰). ستاری و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که عصاره

همچنین کریمی و همکاران، (۲۰۱۴) به ترتیب ۱۰۰ و ۹۴ درصد بود، درحالی‌که در پژوهش حاضر میزان حساسیت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها به ترتیب ۳۱/۱۱ و ۲۶/۶۶ درصد بود که از دو مطالعه دیگر کمتر است که ممکن است، تفاوت نتایج مربوط به تفاوت جمعیت شهری و بیماران و یا عوامل دیگری که در حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها باشد (۲۸ و ۲۹).

در سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۵ بر اساس گزارش منتشره، فراوانی ESBL در گونه‌های کلسیلا، ۱۹ درصد گزارش شد (۳۰). در مطالعه‌ای، (۲۰۰۵) بیشترین شیوع ESBL در سوبه‌های کلسیلا پنومونیه جداسازی شده، از آمریکای لاتین با فراوانی ۴۵ درصد و کمترین میزان فراوانی ۵ درصد در کانادا گزارش شده است (۳۱). در یک بررسی (۲۰۰۴) بر روی جدایه‌های کلسیلا پنومونیه، از نمونه‌های ادراری بیماران بستری در بخش‌های مراقبت‌های ویژه‌ی بیمارستان مشخص گردید، ۲۵/۶ درصد سوبه‌ها مولد ESBL بوده‌اند (۳۲). فراوانی ESBL در هندوستان از ۶ تا ۸۷ درصد گزارش شده است (۳۳). در کشورهای اروپایی نیز شاهد تنوع شیوع این آنزیم‌ها هستیم، به‌طوری‌که در برخی از بیمارستان‌های کشور فرانسه فراوانی این آنزیم‌ها بیش از ۴۰ درصد گزارش شده است و سال‌های اخیر میزان ESBL در آمریکا، کانادا، چین و ایتالیا نیز افزایش چشمگیری داشته است (۳۴). در یکی دیگر از مطالعات در سال‌های ۲۰۰۰-۱۹۹۷ شیوع این آنزیم‌ها در آلمان ۱/۵ درصد و در روسیه، ترکیه و یونان در دامنه ۳۹ تا ۴۷ درصد گزارش شده است (۳۱). در این مطالعه نیز، از ۴۵ جدایه کلسیلا پنومونیه، ۵۷/۷۷ درصد از نظر فنوتیپی مولد ESBL بوده‌اند.

یزدی و همکاران (۲۰۱۰) فراوانی ژن‌های TEM و SHV را ۸۷/۱ و ۷۰/۶ درصد، گزارش کردند (۳۵). ناصحی و همکاران (۲۰۱۰) فراوانی ژن‌های TEM و SHV را، در کلسیلا پنومونیه جداساده در بیمارستان لبافی نژاد تهران ۶۷/۴ و ۴۶/۵ درصد گزارش کردند (۱۷). در این مطالعه فراوانی ژن‌های TEM ۱۱ درصد بود که کمتر از نتایج یزدی و همکاران و ناصحی و همکاران بوده است، ولی فراوانی ژن‌های SHV ۴۲ درصد بودند که کمتر از نتایج یزدی و همکاران و بسیار مشابه ناصحی و همکاران بوده است.

از ۲۶ جدایه این باکتری در مجموع ۲۴ جدایه (۵۳٪) حامل ژن‌های TEM و SHV بوده که از این میان ۵ جدایه (۱۱٪) ژن TEM مثبت، ۱۹ جدایه (۴۲٪) ژن SHV، ۵ جدایه (۱۱٪) نیز

عصاره هیدروالکلی برگ ازگیل بر روی پروماستیگوت *لشمانیا*، در شرایط آزمایشگاهی پرداختند و دریافتند که با افزایش غلظت عصاره برگ ازگیل تعداد پروماستیگوت‌ها کاهش می‌یابد و در نتیجه عصاره برگ ازگیل می‌تواند، به‌عنوان یک داروی ضد *لشمانیا* مورد استفاده قرار گیرد (۴۲).

در این مطالعه حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره‌های آبی و اتانولی ازگیل به ترتیب بین ۲۵۰-۱۶۵ میلی‌گرم بر میکرولیتر است و همچنین حداقل غلظت کشندگی (MBC) به ترتیب بین ۱۰۰۰-۶۰۰ میلی‌گرم بر میکرولیتر است،

به‌طور کلی ازگیل به‌عنوان یک گیاه دارویی و سنتی، در کشورهای آسیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد و از روزگاران دور، خواص دارویی ازگیل بسیار مورد توجه بوده و در طب سنتی از این میوه در تقویت اعصاب، معالجه اسهال اطفال، درمان خونریزی‌های داخلی مانند بواسیر، خونریزی رحمی، ورم روده، زخم دهان، تورم مخاط گلو و تقویت پوست‌های حساس استفاده می‌شود (۱۲). طبق مطالب موجود در کتب اسلامی جوشانده برگ ازگیل، نیمه گرم یا خشک، سبب درمان سالک می‌شود. ازگیل دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و تحریک‌کننده سیستم ایمنی دارای اثرات ضد میکروبی و فعالیت‌های ضد توموری است و عملکردهای دارویی ازگیل به‌شدت در ارتباط با ترکیبات پلی‌ساکاریدی، فلاوونوئیدها، کاروتن‌ها و سایر ترکیبات طبیعی موجود در بخش‌های مختلف آن است (۱۱). نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر فراوانی ESBL در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های ادراری در شهر رشت است. با توجه به حساسیت این جدایه‌ها به عصاره‌های گیاهی مورد مطالعه و نیز فراوانی رویش این گیاهان در منطقه اکالیپتوس و ازگیل می‌توانند، به‌عنوان منابع طبیعی در دسترس و از عوامل ضد میکروبی مؤثر در درمان عفونت‌های ادراری مورد توجه قرار گیرند، ولی استفاده از این گیاهان به‌عنوان جایگزین داروهای شیمیایی به دلیل تداخل اثر درمانی آنتی‌بیوتیک‌ها با عصاره گیاهان، نیازمند انجام مطالعات بیشتر است.

تشکر و قدردانی

از تمامی همکاران گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش با کد ثبت پایان‌نامه به شماره ۶۱۳۳۰۵۰۷۹۳۱۰۰۱، کمال تشکر و سپاسگزاری را داریم.

الکلی اکالیپتوس کامالولنسیس با غلظت معادل ۳۲/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و عصاره آبی آن با غلظت ۱۷/۵ میکروگرم بر میکرولیتر می‌تواند به‌خوبی از رشد جدایه‌های استاندارد *سودوموناس آیروژینزا* جلوگیری به عمل آورد (۱۳). اولین گزارش از اثر بازدارندگی عصاره متانولی اکالیپتوس بر روی *P. tolaasii* با قطر هاله بازدارندگی A میلی‌متر است که این میزان اثر بازدارندگی در عصاره آبی اکالیپتوس و دیگر حلال‌ها مشاهده نگردید؛ زیرا عصاره آبی فاقد هاله بازدارندگی و حلال‌های اتانولی و استونی به ترتیب ۳ و ۴ میلی‌متر بوده است (۴۰). نتایج بررسی Babyi و همکاران (۲۰۰۴) بر روی عصاره متانولی اکالیپتوس کامالولنسیس و اثرات ضد میکروبی آن نشان می‌دهد که عصاره متانولی این‌گونه اثرات ضد میکروبی قوی علیه باکتری‌های *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس سرئوس* از خود نشان می‌دهد (۴۱).

در این مطالعه حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره‌های آبی و اتانولی اکالیپتوس به ترتیب بین ۳۱-۱۷/۵ میلی‌گرم بر میکرولیتر است و همچنین حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های آبی و اتانولی به ترتیب بین ۱۶۵-۲۵۰ میلی‌گرم بر میکرولیتر است، عصاره برگ‌های این گیاه به علت دارا بودن ترکیبات شیمیایی مختلف، مانند ترکیب اکسیدی به نام سینئول، دارای فعالیت‌های بیولوژیکی وسیع از جمله خواص ضد سرطانی، التهاب، درد، ازدیاد قند خون و خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد مالاریایی، قارچی و ویروسی است که به شکل سنتی، برای درمان تب‌های خاص مثل تب ناشی از مالاریا و تیفوئید و درمان برخی از التهابات پوستی مثل سوختگی و زخم کاربرد دارند، همچنین عصاره آبی گونه‌های مختلف اکالیپتوس برای درمان سل، اسهال خونی، باکتریایی، درد مفصل و موارد مشابه در داروهای غربی و شرقی به کار می‌رود و گیاهان موجود در این خانواده نیز به‌طور وسیعی در داروسازی، صنایع غذایی و لوازم‌آرایشی کاربرد دارند. برگ‌های اکالیپتوس بر روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم منفی و مثبت مانند گونه‌های کلبسیلا مؤثرند (۳۶). در یک مطالعه، فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی برگ ازگیل در مقابل باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینزا* مورد بررسی قرار گرفت که در بین سویه‌های بررسی‌شده بیشترین فعالیت ضد میکروبی علیه سویه *اشرشیاکلی* بود که قطر هاله ایجادشده در اطراف آن ۱۹/۶۷ میلی‌متر است (۱۱). اسدی و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی اثر



تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض منافع وجود ندارد.

References

1. Davis T J, Matsen J M. Prevalence and characteristics of *Klebsiella* species: relation to association with a hospital environment. *Journal Infection Disease*.2004; 130(1): 402-405.
2. Camprubi S, Merino S, Benedi J, Thomas JM. The role of the O-antigen lipopolysaccharide and capsule on an experimental *Klebsiella pneumoniae* infection of the rat urinary tract. *FEMS Microbiol Lett*. 1993; 111: 9-13.
3. Yadollahi H. Common bacterial causes and antibiogram of urinary tract infection among children in Chaharmahal & Bakhtiari province. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2002; 4(1): 45-50. [In Persian]
4. Mitchell J, Navon-Venezia S, Schwartz D, Carmeli Y. High levels of antimicrobial resistance among extended spectrum-lactamase producing *Enterobacteriaceae*. *Am Soc Microbiol*. 2005; 49(5): 9-21.
5. Griffiths E. The iron-uptake systems of pathogenic bacteria. In: Bullen J, Griffiths E, editors. *Iron and infection*. New York, N.Y: John Wiley & Sons, Inc.1987; p. 69-137.
6. Muller S, Oesterlein A, Frosch M, Abele-Horn M, Valenza G. Chracterization of extended-spectrum beta-lactamases and gnr plasmid- mediated quinolone resistance in german isolates of *Enterobacter* spp. *Microb Drug Resist*. 2011; 17(1): 99-103.
7. Al-Charrakh AH, Yousif SY, Al-Janabi HS . Occurrence and detection of extended-spectrum - lactamases in *Klebsiella* isolates in Hilla, Iraq . *African Journal of Biotechnology*.2011; 10(4): 655-657.
8. Albano F, Thompson MR, Orru S, Scaloni A, Musetta A, Pucci P, et al. Structural and functional fea- tures of modified heat- stable toxins produced. *ASM Journal*. 2000; 48(5): 685-690.
9. Cornaglia G, Mazzariol A, Lauretti L, Rossolini GM, Fontana R. Hospital outbreak of carbapenem-resistant experimental *Klebsiella pneumoniae* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. *Clin Infect Dis* .2000; 31(5):25-119.
10. Abdolazade P, Shapouri R, NasiriSemnani SH. Antibacterial Effects of *Eucalyptus globulus* Extracts on *Brucellamelitensis* M16 and *Brucella abortus* S99 In Vitro and In Vivo. *J Ardabil Univ Med Sci*. 2011; 11(3):218-227. [In Persian]
11. Bibalani GH, MosazadehSayadmahaleh F. Medicinal benefits and 16-usage of medlar (*Mespilus germanica*) in Giluan province (Roudsar District), Iran. *J Med Plants Res*. 2012; 6(7):9 -115.
12. Sadat Tabatabaei N, Mazandarane M, editors. *Autocology and ethnopharmacology of Mespilus germanica in the North of Iran*. AIP Conference Proceedings .2008; 9(2)32-34.
13. Sattari M, Shahbazi N, Najar Sh. The antibacterial activity of methanolic extract of *Eucalyptus* against Bacteria.J Tarbiat Modarres.2005; 8(1):19-23. [In Persian]
14. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Baily and Scott diagnostic microbiology. 12th ed. Missouri: Mosby Elsevir; 2007. 525-32.
15. Steele RW. *Clinical Handbook of Pediatric infectious Disease*: CRC Press. 2013.
16. Datt N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature*. 1965; 20(8): 44 -239.
17. Nasehi L, Shahcheraghi F, Nikbin VJ, Nematzadeh S. PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lactamases in clinical Isolates of *Klebsiella pneumonia* Isolated Tehran, Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*.2010; 13(3):111-118.
18. Moini F, Mohammadi M, Shahanipoor K. Evalution of the antibacterial effect of methanol and aquens extracts of *vaccinium arctostaphylos* fruit against *Salmonella* spp in vitro. *J Rafsanjan Univ Med Sci*. 2015; 14(4): 257-268. [In Persian]
19. Yvonne P, Angela C, Wolfgang W. Resistance to cephalosporin and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International J Med Microbiol*. 2010; 300(6): 371-379.
20. Owlia P, Saderi H, Rasooli I, Sefidkon, F. Antimicrobial characteristics of some herbal oils on *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to

their chemical compositions. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2009; 8(2):107-114.

21. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, Epidemiology and Clinical Importance of Emerging Strains of Gram-negative Bacilli Producing Extended-spectrum Beta-lactamases. *Res Microbial*. 2004; 155(6): 21-409.

22. Field M, Graf LH, Laird WJ, Smith PL. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978; 75:2800-2804.

23. Torshizi R, Zamanzad B, Mokhtari K, Karimi A. Identification of bla-CTX-M B-lactamase in *Enterobacteriaceae* clinical isolates by polymerase chain reaction. *Journal of Shahrkord University of Medical Science*. 2010; 13(3): 9-17. [In Persian]

24. Ghafourin S. The prevalence of ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* some major hospitals, Iran. *The Open Microbiology Journal*. 2011; 5:91-95.

25. Paymani A, Moenirad M, Naserpour T, Sanieh R, Javadi A, Pahlavan A. Identification of CTX-M and SHV B-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates by polymerase chain reaction in Qazvin City. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2012; 18(60): 15-20.

26. Lashgari N, Yousefivand J, Siadt SD, Khosravi M. Identification of bla-CTX-M B-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates by polymerase chain reaction. *Medical Sciences*. 2013; 24(3):148-152. [In Persian]

27. Akbari M, Amirmozafari N. The prevalence of extended-spectrum beta lactamase in *Enterobacteriaceae* isolated from urinary tract infections in Ardabil, Iran. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*. 2014; 14(3): 285-291. [In Persian]

28. Asgari SH, Hadadi 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. [In Persian]

29. Karimi S, Hadadi A, Torabzadeh P. Investigating the anti-bacterial effect of *Vaccinium arctostaphylos* extracts against extended spectrum beta lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* from in Karaj city. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2017; 21(2): 75-85. [In Persian]

30. Johnson AP, Weinbren MJ, Ayling-Smith B, Bois SK, Amyes SG, George RC. Outbreak of infection in two UK hospital caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* resistant to cefotaxime and ceftazidime. *J Hosp Infect*. 2005; 20(2):97-103.

31. Maayan M C, Ofek I, Medalia O, Aronson M. Population shift in mannose-specific fimbriated phase of *Klebsiella pneumoniae* during experimental urinary tract infection in mice. *Infect Immun*. 1985; 49:785-789.

32. Meyer L, Labuschagne CDJ, Ehlers MM, Dove MG, Weldhagen GF. Diversity of bla-type genes in extended-spectrum b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated during 2003 - 2004 at Pretoria academic hospital. *The Southern African J Epidemiol and Infect*. 2007; 22 (1):5-7.

33. Babouee B, Widmer AF, Dubuis O, Ciardo D, Droz S, Betsch BY. Emergence of four cases of KPC - 3- carrying *Klebsiella pneumoniae* introduced to Switzerland, 2009-10. *Euro Surveill*. 2011; 16(11):16-79.

34. Yvonne P, Angela C, Wolfgang W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International J Med Microbiol*. 2010; 300(6):371-379.

35. Yazdi M, Nazemi A, Mirsaed MN, KHataminezhad MR, SHarifi SHA, Babaeikochaksaraei M. Prevalence SHV/CTX-M/TEM genes in *Escherichia coli* producing Extended Spectrum β -lactamase isolated from urinary infection in Tehran city. *Laboratory science journal*. 2010; 4(1):120-124.

36. Osawa K. Macrocyclics H.I and J form the leaves of *Eucalyptus globulus*. *J Nat Prod*. 2000; 59(9): 823-827.

37. Panttnaik S. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. *Microbios*. 2005; 86(349):237-246.

38. Srinivasan D, Nathan S, Suresh T. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *J Ethnopharmacol*. 2006; 74: 217-220.

39. Favre-Bonte S, Darfeuille-Michaud A, Forestier C. Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to human Intestine-407 cells. *Infect Immun*. 1995; 63:1318-1328.

40. Jiang F, Yuan L, Han L. outbreak of infection caused by *Enterobacter cloacae* producing the novel VEB-3 Betalactamase in china. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:31-826.

41. Babyi H, Kolo I, Okogun J, Ijah U. The antimicrobial activities of methanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Biokemistri*. 2004; 16(2):11-106.

42. Asadi M, Bahrami S, Ansari N, Pakniat N. The antimicrobial activities of methanolic extract of tea



and *Mespilus germanica* against some *Leishmania* major promastigotes. Journal of Hormozgan University of Medical Science. 2010. 15(4); 379-284. [In Persian]



Original Article

The Anti-Bacterial Effect of Eucalyptus and Medlar Extracts Against Klebsiella Pneumonia in Rasht Hospitals

Basbus M, Asadpour L, Pourghafar H*

Department of Microbiology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Received: 19 May 2020

Accepted: 13 July 2020

Abstract

Background & Objective: Klebsiella pneumonia is an opportunistic pathogen in nosocomial infections. Nowadays using plant-based drugs against drug resistant bacterial infections is gaining special importance. The aim of this study was to evaluate the prevalence of extended spectrum beta lactamase producing clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and the antibacterial effects of aquatic and ethanol extracts of Eucalyptus and Medlar against these bacteria in Rasht.

Materials & Methods: In this study, a total of 45 isolates of K. Pneumonia were collected from urinary tract infections. ESBL production was determined by the double disk diffusion and disk diffusion was tested and specific primers PCR method was used to detect TEM and SHV genes. To investigate inhibitory effect of Eucalyptus and Medlar leaf extracts against ESBLs harboring ESBL isolates, well diffusion method and broth macro dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration.

Results: 26 Out of 45 isolates, 57% phenotypically recognized as ESBL producing and based on the results of PCR, the prevalence of SHV genes among ESBLs-positive isolates was 42% SHV and 11% TEM positive isolates were detected. MIC of Eucalyptus extracts ranged between 17/5 - 31mg/ml and Medlar extracts ranged between 165-250 mg/ml. MBC of Eucalyptus extracts ranged between 600-1000mg/ml and Medlar extracts 500-1000mg/ml.

Conclusion: The obtained results showed that Eucalyptus and Medlar extracts possess significant antibacterial activity against resistant bacteria. So these plant extracts may be used as an accomplishment in Klebsiella infection treatment, particularly in topical treatment of urinary tract infections.

Keywords: Klebsiella pneumonia, ESBLs, Eucalyptus, Medlar, TEM, SHV

*Corresponding Author: pourghafar Houra, Department of Microbiology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

G-mail: Houraghafari@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-4443-2414>