مقاله پژوهشی

اثر ضد میکروبی عصاره‌های اکالیپتوس و ازگیل بر *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از عفونت های ادراری در بیمارستان‌های رشت

مریم باسبوس، لیلا اسدپور، حورا پورغفار*

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

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۲/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۴/۲۳

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 پنومونیه*‌های 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 موردبررسی قرار گرفت، سپس اثر ضدمیکروبی 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 براث ماکرودایلوشن 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 ۳۱-۱۷/۵و ۲۵۰-۱۶۵ میلی‌گرم بر میکرولیتر و MBC به ترتیب بین ۱۶۵-۲۵۰ و ۱۰۰۰-۶۰۰ میلی‌گرم بر میکرولیتر است.

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

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

مقدمه

کلبسیلاها پاتوژن‌های فرصت‌طلبی هستند که در همه جای طبیعت به‌ویژه در سطح آب، فاضلاب، خاک و گیاهان و سطوح غشای مخاطی پستانداران ازجمله 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 *انتروباکتریاسه* که اندازه آن‌ها ۰/۳ تا 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

*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

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 شناخته‌شده 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 ضدمیکروبی 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 ازآنجایی‌که 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* باواسطه پلاسمیدها خود انتقال‌دهنده‌ای است که بتالاکتامازهای وسیع الطیف مشتق از ژن‌های TEM و SHVاست 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 گزارش‌شده است. این باکتری به دلیل اکتساب پلاسمیدهایی که بتالاکتامازهای وسیع الطیف و آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدی را رمز می‌کنند به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله سفالوسپورین‌های وسیع الطیف و آمینوگلیکوزیدها مقاوم‌اند. بدین ترتیب احتمال درمان عفونت‌های *کلبسیلایی* توسط این آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار ضعیف شده و ضرورت دستیابی به مواد ضدمیکروبی 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 آن تأکید دارد. گیاهان دارویی به‌عنوان یک منبع بالقوه، مواد ضدمیکروبی 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 *Myrtaceace* از گیاهان بومی استرالیا و تاسمانی است و یکی از معروف‌ترین گیاهان دارویی است که از دیرباز اثرات ضد میکروبی آن موردتوجه 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 $C_{10}H_{18}0$ 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 Glycosidesفلورگلوسینول، آلفاپنین، آلدهیدهای 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 ۳-۲ 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 داده‌شده‌اند که مقدار آن‌ها در طی مراحل مختلف رسیدن میوه متغیر است. اسیدهای چرب اصلی موجود در مزوکارپ میوه ازگیل شامل پالمتیک اسید، آلفالینولنیک‌اسید و لینولنیک‌اسید می‌باشند، اما مقادیری اولئیک‌اسید و استئاریک‌اسید نیز در آن وجود دارد. اسیدهای آلی موجود در میوه ازگیل به‌طور عمده از نوع اسید مالیک، اسیدسیتریک و اسیدتارتاریک می‌باشند. ازجمله ویتامین‌های موجود در این میوه می‌توان به ویتامین ث و گروه ب اشاره کرد (۱۲).

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

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

اثر ضدمیکروبی به فراوانی در جنگل‌های گیلان وجود داشته و به‌آسانی در دسترس هستند، درصورتی‌که وجود خواص ضدمیکروبی آن‌ها بر ضد باکتری‌های مقاوم به داروهای نسل جدید با طیف اثر وسیع ثابت گردد، می‌تواند به‌عنوان یک رهیافت جدید در درمان عفونت‌های *کلبسیلایی* 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 Kirbery 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 (30µg)، سفیکسیم (5µg)، سفتازیدیم (30µg)، سفریاکسون (30µg)، سفوتاکسیم (30µg)، کلاونیک‌اسید (10µg) و همچنین دو دیسک ترکیبی با کلاونیک‌اسید (سفتازیدیم/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 عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد. درصورتی‌که 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 (5U/ μl) 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 تائید، جهت تهیه عصاره (آبی و اتانولی) از روش خیساندن

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 پس‌ازآن 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. درنهایت 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 متوقف کننده رشد MBC محاسبه گردید، به روش ماکردایلوشن در لوله‌های مورد آزمایش تکرار و سپس سه بار با کشت بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار تائید شدند (۱۸).

تجزیه‌وتحلیل آماری: برای این منظور از تجزیه‌وتحلیل داده‌های حاصل از آمار توصیفی (تعداد، درصد و نمودار) و آمار استنباطی (آزمون کای دو) به کمک نرم‌افزار SPSS استفاده شد و P< ۰/۰۵ ازنظر آماری با معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

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

ارزیابی حساسیت میکروبی و نتایج غربالگری گونه‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (*EBLS*) به روش دوبل دیسک دیفوژن: 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 درمجموع ۲۶ جدایه (۵۷/۷۷ درصد) تولیدکننده *EBLS*، با روش دوبل دیسک دیفوژن جداسازی گردید (جدول ۲).

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

استخراج‌شده کلیه جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* انجام شد. از ۲۶ جدایه این باکتری درمجموع 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 ازنظر حضور هم‌زمان هر دو ژن مثبت بودند (تصویر الکتروفورز محصول *PCR* ژن‌های *TEM* و *SHV* در شکل ۱ آمده است).

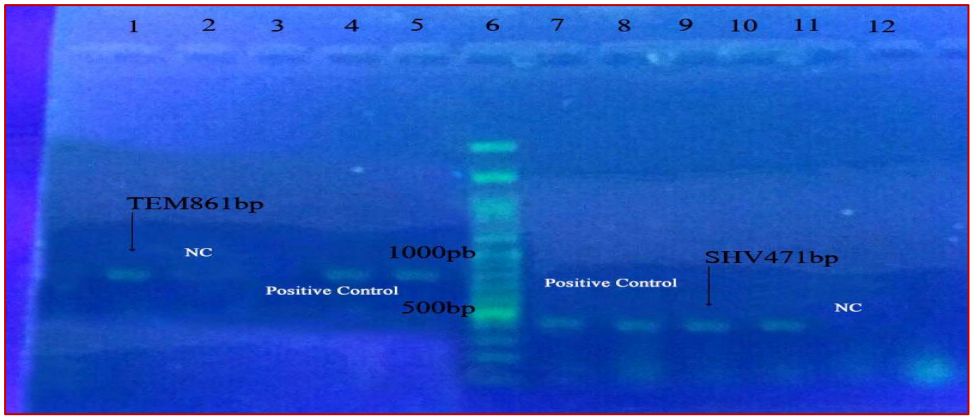
۲۲/۷۰ (اتانولی اکالیپتوس)، ۱۹/۳۵ (آبی ازگیل) و ۱۷/۴۱(اتانولی ازگیل) میلی‌متر بوده است.

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

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

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



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 (۴۷۱bp) در ستون‌های ۹ و ۱۰. NTC کنترل منفی در ستون‌های ۲ و ۱۲ و ستون‌های ۲ و ۷ کنترل مثبت (*کلبسیلا پنومونیه* ATCC33591). Ladder 100 bp جفت

نتایج بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره‌ها به روش انتشار چاهکی در آگار: اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی اکالیپتوس و ازگیل بر ۲۶ جدایه، *کلبسیلا پنومونیه* تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع طیف، به روش انتشار چاهک موردبررسی قرار گرفت. همه جدایه‌ها به عصاره‌های گیاهان موردمطالعه حساس بوده‌اند و ازنظر قطر هاله عدم رشد ایجادشده در جدایه‌های حساس و مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P< ۰/۰۵$).

متوسط قطر هاله عدم رشد ایجادشده توسط عصاره آبی و اتانولی اکالیپتوس و ازگیل به ترتیب ۲۱/۰۵ (آبی اکالیپتوس)، 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 سن‌های متفاوت است. مهم‌ترین عامل عفونت مجرای ادراری در دنیا بعد از *اشرشیاکلی*، *کلبسیلا پنومونیه* است. این باکتری در ۱۶ تا ۱۷ درصد از عفونت‌های ادراری بیمارستانی نقش دارد. به دلیل استفاده، وسیع و نادرست

از آنتی‌بیوتیک‌ها طی دو دهه اخیر، باکتری‌ها مقاوم به درمان شده و افزایش آمار مرگ‌ومیر ناشی از آن‌ها موردتوجه قرارگرفته 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 *کلبسیلایی* در مقایسه با عفونت *اشرشیاکلی* کم‌تر و درنتیجه گردآوری تعداد قابل‌بررسی زمان‌بر بود. مهم‌ترین مکانیسم مقاومت علیه عوامل ضدمیکروبی در باکتری‌های گرم منفی مهم، هیدرولیز آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام توسط آنزیم‌های بتالاکتام است. در این تحقیق سعی شده گام‌هایی در جهت اثبات اثرات ضدمیکروبی 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 *انتروباکتریاسه‌ها* انتقال می‌یابند، تجمع ژن‌های مقاومت، منجر به ایجاد سویه‌های با مقاومت چندگانه می‌شوند؛ بنابراین تعیین الگوی این سویه‌ها ضروری است، چراکه در بررسی‌های اپیدمولوژیک 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 آن‌یک 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* باواسطه پلاسمیدهای خود انتقال‌دهنده‌ای است که ژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف را رمز می‌کنند. شایع‌ترین ژن‌های مربوط به ESBLهای گزارش‌شده، از کشورهای غربی و آسیایی دو ژن TEM و SHV است. TEM و SHV آنزیم‌هایی تولید می‌کنند که توسط اغلب *انتروباکتریاسه‌ها* و بیشتر، *اشرشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه* تولید می‌شوند (۲۰). بررسی‌ها نشان می‌دهند که SHV شایع‌ترین 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 انتشاریافته 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 جداشده 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 تفکیک‌شده از عفونت‌های دستگاه ادراری، ۲۶ درصد دارای ESBL بودند (۲۶). اکبری و همکاران (۲۰۱۳) از بین ۴۰۰ پاتوژن جداشده 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، درنتیجه 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 اکسی 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 کلاونیک اسید به ترتیب ۹۶ و ۸۸ درصد و

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 *کلبسیلا*، ۱۹ درصد گزارش شد (۳۰). در مطالعه‌ای، (۲۰۰۵) بیشترین شیوع ESBL در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداسازی شده، از آمریکای لاتین با فراوانی ۴۵ درصد و کمترین میزان فراوانی ۵ درصد در کانادا گزارش‌شده است (۳۱). در یک بررسی (۲۰۰۴) بر روی جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه*، از نمونه‌های ادراری بیماران بستری در بخش‌های مراقبت‌های ویژه‌ی بیمارستان مشخص گردید، ۲۵/۶ درصد سویه‌ها مولد ESBL بوده‌اند (۳۲). فراوانی ESBL در هندوستان از ۶ تا ۸۷ درصد گزارش‌شده 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 گزارش‌شده است و سال‌های اخیر میزان ESBL در آمریکا، کانادا، چین و ایتالیا نیز افزایش چشمگیری داشته است (۳۴). دریکی 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 گزارش‌شده است (۳۱). در این مطالعه نیز، از ۴۵ جدایه *کلبسیلا پنومونیه*، ۵۷/۷۷ درصد ازنظر 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 *کلبسیلا پنومونیه* جداشده 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 درمجموع 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 ازنظر حضور هم‌زمان هر دو ژن مثبت بودند. با توجه به شیوع گسترده مقاومت دارویی، استفاده از گیاهان به‌عنوان مخازن طبیعی عوامل ضدمیکروبی بسیار موردتوجه قرارگرفته است. مطالعه حاضر نیز باهدف دستیابی به عوامل ضدمیکروبی مؤثر بر *کلبسیلاهای* تولیدکننده بتالاکتامازهای طیف وسیع به بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره اکالیپتوس و ازگیل بر این باکتری‌ها پرداخته است. در مطالعه ما همه جدایه‌ها به عصاره‌های گیاهان موردمطالعه حساس بوده‌اند و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره‌های آبی و اتانولی اکالیپتوس و ازگیل به ترتیب بین ۳۱-۱۷/۵میلی‌گرم 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 ضدمیکروبی معرفی گردیده است. Osawa و همکاران (۲۰۰۰) طی مطالعه‌ای در ژاپن نشان دادند که برخی از ترکیبات به‌دست‌آمده از برگ‌های *E. gloulus* دارای فعالیت ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی 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 ۲۰-۰/۱۶و ۱۰-۰/۲۵میلی‌لیتر در میکرولیتر گزارش نمودند (۳۷). Srinivasan و همکاران (۲۰۰۶) قطر هاله بازدارنده از رشد عصاره اکالیپتوس را برای باکتری *سودوموناس آئروژنزا* 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 موردبررسی قرار گرفت و نشان داده شد که قطر هاله بازدارنده نسبت به شاهد بسیار قابل‌ملاحظه بود، به‌طوری‌که این هاله در سویه‌های *استرپتوکوکوس پایوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب مقدار ۵۱-۲۵ و ۴۸-۲۲ میلی‌متر و در سویه‌های *اشرشیاکلی* ۴۷-۲۳ میلی‌متر مشاهده شد (۳۹). در مطالعه دیگری اثر بازدارندگی عصاره متانولی اکالیپتوس روی *سودوموناس آیروژینوزا* ۱۵ میلی‌متر گزارش‌شده است (۲۰). ستاری و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که عصاره

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 آیروژنزا* 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 کامالدولنسیس و اثرات ضدمیکروبی آن نشان می‌دهد که عصاره متانولی این‌گونه اثرات ضدمیکروبی قوی علیه باکتری‌های *باسیلوس سوبتلیس* و *باسیلوس سرئوس* از خود نشان می‌دهد (۴۱).

در این مطالعه حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره‌های آبی و اتانولی اکالیپتوس به ترتیب بین ۳۱-۱۷/۵میلی‌گرم 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 ازجمله 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 آئروژینوزا* موردبررسی قرار گرفت که در بین سویه‌های بررسی‌شده بیشترین فعالیت ضدمیکروبی علیه سویه *اشرشیاکلی* بود که قطر هاله ایجادشده در اطراف آن ۱۹/۶۷ میلی‌متر است (۱۱). اسدی و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی اثر عصاره هیدروالکلی برگ ازگیل بر روی پروماستیگوت *لیشمانیا*، در شرایط آزمایشگاهی پرداختند و دریافتند که با افزایش غلظت عصاره برگ ازگیل تعداد پروماستیگوت‌ها کاهش می‌یابد و درنتیجه عصاره برگ ازگیل می‌تواند، به‌عنوان یک داروی ضد *لیشمانیا* مورداستفاده 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،

به‌طورکلی ازگیل به‌عنوان یک گیاه دارویی و سنتی، در کشورهای آسیایی مورداستفاده قرار می‌گیرد و از روزگاران دور، خواص دارویی ازگیل بسیار موردتوجه 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 ضدمیکروبی 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 موردمطالعه و نیز فراوانی رویش این گیاهان در منطقه اکالیپتوس و ازگیل می‌توانند، به‌عنوان منابع طبیعی در دسترس و از عوامل ضدمیکروبی مؤثر در درمان عفونت‌های ادراری موردتوجه 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.

تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی 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. Abdolahzade 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, Mazandaranee 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 Entrobacteriacea 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 pneumonia 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 pneumonia 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 pneumonia 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 Entrobacteriaceae 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 pneumonia 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 pneumonia 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 offour 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, NazemiA, MirsaedMN, KHataminezhad MR, SHarifi SHA, Babaeikochaksaraei M. Prevalence SHV/CTX-M/TEM genes in Esherichia coli producing Extended Spectrum β-lactamase isolated from urinary infection in Tehran city. Laboratory science journal.2010; 4(1):120-124.
36. Osawa K. Macrocarpals 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 folkoric 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 Entrobacter 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 pnemoniae 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