[DOI: 10.29252/ismj.22.3.150]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:09 +0330 on Friday September 25th 2020

دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و دوم، شماره ۳، صفحه ۱۵۹ – ۱۵۰ (مرداد و شهریور ۱۳۹۸)

Iran South Med J 2019; 22(3): 150-159

بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره خام برگ گیاه حرا بر روی سویه‌های استاندارد و بالینی *Acinetobacter baumannii* در شرایط In-vitro

مهدی محمودپور (MD)[1*]، اعظم عسکری (MSc)[2]، فروغ یوسفی (PhD)[2**]

[1] مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج‌فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی خلیج‌فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

[2] گروه میکروب‌شناسی و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

(دریافت مقاله: ۹۷/۱۲/۲۲ – پذیرش مقاله: ۹۸/۲/۱۵)

چکیده

زمینه: *اسینتوباکتر بومانی* ***Acinetobacter baumannii*** یک پاتوژن فرصت طلب و یکی از عوامل عفونت بیمارستانی است. متأسفانه بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری مسبب مشکلات جدی مانند عدم موفقیت درمان و افزایش بروز مرگ و میر در بیماران می‌باشد. گیاهان مانگرو و بخصوص گیاه حرا ***Avicennia marina*** منبع زیستی بالقوه‌ای برای ترکیبات دارویی جدید می‌باشند به گونه‌ای که در طب سنتی برای درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. هدف این مطالعه تعیین اثر ضد باکتریایی عصاره خام برگ گیاه حرا بر روی سویه مرجع و بالینی *اسینتوباکتر بومانی* در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه برگ گیاه حرا در هوای آزاد و در سایه خشک شده و سپس به‌صورت پودر درآمد. از این پودر عصاره گلیسیرینه با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد و اثر ضد باکتریایی آن بر سویه مرجع *اسینتوباکتر بومانی* و همچنین سویه بالینی مقاوم به کارباپنم با روش انتشار از چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) آن تعیین گردید.

یافته‌ها در این بررسی در روش انتشار از چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره برگ حرا بر هر ۶ سویه مورد بررسی مؤثر بوده و تأثیری قابل مقایسه با کنترل مثبت نشان داد. حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره برگ حرا بر همه سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مورد استفاده در این مطالعه ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی برگ گیاه حرا بر سویه مرجع *اسینتوباکتر بومانی* ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. در این مطالعه مقاوم‌ترین سویه نسبت به عصاره برگ حرا، سویه بالینی مقاوم به سفپیم بود.

نتیجه‌گیری: عصاره برگ گیاه حرا دارای اثر ضد باکتریایی قابل ملاحظه‌ای بر روی سویه مرجع *اسینتوباکتر بومانی* و همچنین سویه‌های بالینی مقاوم به کارباپنم بود.

واژگان کلیدی: *اویسنیا مارینا*، *اسینتوباکتر بومانی*، فعالیت ضد میکروبی، حداقل غلظت مهار کنندگی، حداقل غلظت کشندگی

** بوشهر، گروه میکروب‌شناسی و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

Email: F.yousefi@gmail.com
***ORCID: 0000-0002-9764-3322**
****ORCID: 0000-0001-9342-4686**

[DOI: 10.29252/ismj.22.3.150]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:09 +0330 on Friday September 25th 2020

مقدمه

اسینتوباکترها باسیل‌های گرم منفی هوازی، بدون حرکت و اکسیداز منفی هستند که منابع طبیعی آن‌ها هنوز به طور کامل مشخص نشده است (۱).

اسینتوباکترها بی‌شک یکی از موفق‌ترین پاتوژن‌ها در سیستم‌های بهداشتی مدرن به حساب می‌آیند (۲). شیوع *اسینتوباکترها*، با توجه به افزایش انواع روش‌های جراحی، استفاده از انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و وجود میزبان‌های مبتلا به ضعف ایمنی، در اکثر بیمارستان‌ها افزایش یافته است. وجود قابلیت‌های ژنتیکی منحصر به فرد در این ارگانیسم که منجر به تولید فاکتورهای دخیل در بروز مقاومت آن‌ها نسبت به محیط‌های خشن شده است و نیز ایجاد اپیدمی‌های گسترده و شیوع آن در سراسر جهان بدلیل قابلیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی چند دارویی (۲)، سبب شده است که این ارگانیسم در طی دو دهه اخیر مورد توجه بسیاری از محققین قرار بگیرد.

ابتلا به *اسینتوباکترهایی* با مقاومت چند دارویی به فاکتورهای مختلفی نظیر آلودگی‌های محیطی و تماس با مراقبین سیستم‌های بهداشتی و درمانی که دارای کلونیزاسیون این ارگانیسم هستند، وابسته است (۳). همچنین فاکتورهای غیر وابسته‌ای که منجر به ابتلا به بعضی گونه‌های اسینتوباکتر می‌شوند شامل بستری در بیمارستان‌های با حجم تخت بالای ۵۰۰، درمان‌های اخیر آنتی‌بیوتیکی، اعمال جراحی بر روی سیستم ادراری تناسلی (۴) و بستری قبلی در بخش مراقبت‌های ویژه می‌باشد (۵).

از آنجایی که آنتی‌بیوتیک‌های اندکی بر روی این ارگانیسم‌ها اثربخشی دارند و نیز به‌دلیل افزایش احتمال بروز انواع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، یافتن ترکیبات ضدمیکروبی جدید با قابلیت کشندگی بالا و با کمترین احتمال بروز مقاومت میکروبی، ضروری است.

دریا به عنوان یک منبع عظیم دربردارنده انواع موجودات و ترکیبات فعال زیستی با توانایی‌های متنوع و شگفت‌انگیز، می‌تواند سر منشأ و الهام‌بخش انواع تحقیقات بالینی در زمینه تشخیص و درمان بیماری‌ها به حساب آید. نتایج امیدبخش بسیاری از تحقیقات اخیر در زمینه‌های زیست فناوری و استخراج انواع ترکیبات فعال با قابلیت‌های ضدمیکروبی، ضدسرطانی و ترمیمی، خود اثبات کننده این ادعاست.

گیاهان مانگرو که مجموعه‌ای از گیاهان شورپسند و مقاوم به نمک دریا بوده و در قالب جنگل‌های بین جزر و مدی دریایی به صورت پراکنده در بعضی نقاط دنیا شکل گرفته‌اند، دارای انواع ترکیبات شیمیایی و بیولوژیکی می‌باشند. گیاه حرا *Avicennia marina* از جمله گونه‌های غالب این اکوسیستم به شمار می‌رود.

هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره حاصل از گیاه حرا، بر روی *اسینتوباکترهای* مرجع و نمونه‌های بالینی جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان شهدای خلیج‌فارس و معرفی این عصاره به عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی بر ضد *اسینتوباکترهای* بیمارستانی است.

مواد و روش‌ها

الف) جمع‌آوری و آماده‌سازی عصاره برگ گیاه حرا

در این مطالعه مقطعی برگ‌های گیاه حرا در زمستان سال ۱۳۹۶ از ناحیه "مله گنزه" در سواحل شمالی استان بوشهر که در محدوده منطقه حفاظت شده "مند" قرار دارد، جمع‌آوری، خشک و به‌صورت پودر درآمد. برای تهیه عصاره ۲۲ گرم پودر حاصل در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول گلیسیرین ۲۰ درصد ریخته شده و پس از جذب کامل، حجم نهایی اندازه‌گیری شد. پس از آن مخلوط حاصل حرارت داده شده تا به نقطه جوش رسیده و به

[DOI: 10.29252/ismj.22.3.150]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:09 +0330 on Friday September 25th 2020

مدت ۲۰ دقیقه در نقطه جوش باقی بماند. سپس عصاره‌ها از کاغذ صافی (واتمن شماره ۱) عبور داده شده و در نهایت به منظور یکنواخت‌سازی بیشتر، محلول به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول حاصل اتوکلاو شده سپس عصاره بدست آمده با غلظت نهایی ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در میکروتیوب‌های استریل ۲ میلی‌لیتری تقسیم و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

ب) سویه‌های باکتریایی مورد بررسی

در این طرح از سویه مرجع *اسینتوباکتر بومانی* ATCC 19606 و همچنین ۵ سویه بالینی *اسینتوباکتر بومانی با نام‌های T1، T2، T3، T4 و T5* که از بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان شهدای خلیج‌فارس بوشهر جدا شده بودند، استفاده شد.

ج) تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اسینتوباکتر* بومانی

پس از تأیید نهایی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی، حساسیت سویه‌های باکتریایی با استفاده از روش آگار دیسک دیفیوژن طبق دستورالعمل مؤسسه مرجع آزمایشگاهی و بالینی CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute)(۶) بر روی محیط مولر هینتون آگار (Merk ،Germany) تعیین شد. در این مطالعه از کلاس‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی شامل: آموکسی سیلین کلاولانات، پیپراسیلین- تازوباکتام، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفپیم، آمیکاسین، جنتامایسین، توبرامایسین، سیپروفلوکساسین، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، ایمی‌پنم، مروپنم و کولیستین (Mast ،UK) استفاده گردید.

د) تعیین فعالیت ضدباکتریایی عصاره برگ *اویسنیا مارینا* به روش انتشار از چاهک

در این روش ابتدا از سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مورد نظر سوسپاسیونی معادل نیم مک فارلند (CFU/ml ۱/۵ x۱۰^۸) تهیه گردید سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر سویه بر روی محیط مولر هینتون آگار با سواب استریل به صورت سفره‌ای کشت داده شد. با استفاده از پی‌پت استریل چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر بر روی آگار ایجاد شده و میزان ۷۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره در هر چاهک ریخته شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند و قطر هاله عدم رشد اطراف هر چاهک تعیین گردید. در این بررسی از آنتی‌بیوتیک آمیکاسین به عنوان کنترل مثبت و گلیسیرین ۲۰ درصد (حلال عصاره) به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

ه) غربالگری فعالیت ضدباکتریایی عصاره برگ گیاه *اویسنیا مارینا*

سویه‌های مرجع و بالینی *اسینتوباکتر بومانی* در محیط مایع مولر هینتون (Merk ،Germany) در مجاورت عصاره گیاه *اویسنیا مارینا* قرار گرفتند و میزان رشد باکتری بر اساس Colony forming unit(CFU)/ml (واحد تشکیل دهنده کلونی در هر میلی‌لیتر) محاسبه گردید و با میزان رشد باکتری در لوله کنترل فاقد عصاره مورد مقایسه قرار گرفت.

ی) تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره برگ *اویسنیا مارینا*

حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum (MIC inhibitory concentration) و حداقل غلظت

[DOI: 10.29252/ismj.22.3.150]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:09 +0330 on Friday September 25th 2020

کشندگی (Minimum bactericidal (MBC)) concentration) عصاره برگ *اویسنیا مارینا* بر روی سویه مرجع ATCC 19606 و ۵ سویه بالینی *اسینتوباکتر بومانی* به روش براث ماکرودایلوشن طبق دستورالعمل مؤسسه مرجع آزمایشگاهی و بالینی انجام شد.

برای تعیین MIC، میزان 5×10^5 CFU/ml از هر سویه مورد بررسی در محیط مایع مولر هینتون ۲X در مجاورت رقت‌های دو برابر از عصاره قرار گرفت. در این بررسی کنترل مثبت (باکتری+ حلال عصاره+ محیط مایع مولر هینتون ۲X) و کنترل منفی (عصاره + محیط مایع مولر هینتون ۲X) نیز افزوده شد. لوله در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شده و نتایج پس از ۲۴ ساعت خوانده شد. اولین لوله از غلظت‌های پایین عصاره‌ها که فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری بودند به عنوان حداقل غلظت مهارکننده (MIC) در نظر گرفته شد. حداقل غلظت کشندگی عصاره (MBC) از طریق کشت مجدد ۱۰۰ میکرولیتر از لوله‌های مورد آزمایش بدون کدورت بر روی محیط جامد مولر هینتون تعیین گردید. پس از ۲۴-۱۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری، حداقل غلظتی از عصاره که موجب مهار ۹۹/۹ درصد رشد سویه‌های باکتری‌های مورد آزمایش شد به عنوان حداقل غلظت کشندگی عصاره (MBC) در نظر گرفته شد. تمام مراحل فوق با ۳ بار تکرار انجام گردید.

یافته‌ها

الف) تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مورد بررسی

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اسینتوباکتر بومانی* مرجع ATCC 19606 و سویه‌های بالینی T1 تا T5 در جدول ۱ نشان داده شده است. در این مطالعه همه سویه‌های مورد بررسی نسبت به کولیستین حساس بودند. سویه‌های بالینی T2، T3، T4 و T5 به همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد ارزیابی از جمله کارباپنم‌ها مقاوم بودند و همچنین همه آن‌ها نسبت به سفپیم نیمه حساس بودند. در مقابل سویه T1 نسبت به کارباپنم‌ها حساس ولی به سفپیم مقاوم بود. سویه مرجع *اسینتوباکتر بومانی* ATCC 19606 نسبت به سفتریاکسون و تری‌متوپریم سولفامتوکسازول مقاوم، نسبت به سفتازیدم، سفوتاکسیم، سفپیم و جنتامایسین نیمه حساس و نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بود (جدول ۱).

جدول ۱) الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مورد استفاده در این مطالعه

Code	CST	AMC	CAZ	CRO	CTX	FEP	AMK	GEN	TOB	TZP	IPM	MEM	CIP	SXT
T1	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
T2	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R
T3	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R
T4	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R
T5	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R
ATCC 19606	S	S	I	R	I	I	S	I	S	S	S	S	S	R

SXT: تریمتوپریم- سولفامتوکسازول، CIP: سیپروفلوکساسین، MEM: مروپنم، IPM: ایمی پنم،TZP: پیپراسیلین-تازوباکتام، TOB: توبرامایسین، GEN: جنتامایسین، AMK: آمیکاسین، FEP: سفپیم، CTX: سفوتاکسیم، CRO: سفتریاکسون، CAZ: سفتازیدیم، AMC: آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید، CST: کولیستین، R: مقاوم، I: نیمه مقاوم، S: حساس.

[DOI: 10.29252/ismj.22.3.150]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:09 +0330 on Friday September 25th 2020

ب) تعیین فعالیت ضد باکتریایی عصاره برگ *اویسنیا مارینا* بر سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* به روش انتشار از چاهک

نتایج به‌دست آمده از فعالیت ضدباکتریایی عصاره برگ حرا بر سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است. میزان ۷۰ میکرولیتر از عصاره برگ *اویسنیا مارینا* بر سویه T2، T5 و سویه مرجع با زون مهار رشد به ترتیب ۱۲/۷۸ میلی‌متر، ۱۳/۰۸ میلی‌متر و ۱۳/۰۶ میلی‌متر مؤثر بود. در مقابل میزان ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره برگ گیاه *اویسنیا مارینا* بر هر ۶ سویه مورد بررسی مؤثر بوده و تأثیری قابل مقایسه با کنترل مثبت نشان داد. بیشترین زون مهار رشد در سویه مرجع با ۱۳/۲۶ میلی‌متر و کمترین در سویه T3 با ۱۲/۰۵ میلی‌متر مشاهده گردید (جدول ۲).

جدول ۲) الگوی حساسیت عصاره برگ *اویسنیا مارینا* بر سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی*

Strains Extract	C+	C-	T1	T2	T3	T4	T5	ATCC 19606
۷۰ میلی‌لیتر	۱۳/۰۱±۰/۰۱	-	-	۱۲/۷۸±۰/۱	-	-	۱۳/۰۸±۰/۰۵	۱۳/۰۶±۰/۰۷
۱۰۰ میلی‌لیتر	۱۳/۲۱±۰/۰۱	-	۱۳/۲۳±۰/۸	۱۳/۱±۰/۱	۱۲/۰۵±۰/۰۱	۱۲/۱۴±۰/۷	۱۳/۱۳±۰/۰۲	۱۳/۲۶±۰/۱

نتیجه به‌صورت میانگین زون مهاری±انحراف استاندارد در سه بار تکرار آزمایش گزارش شده است. کنترل مثبت: آمیکاسین، کنترل منفی: گلیسیرین ۲۰درصد

ج) غربالگری اثر ضدباکتریایی عصاره برگ گیاه اویسنیا مارینا

بر اساس نتایج به دست آمده از غربالگری در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هیچ‌کدام از سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مورد بررسی رشد نکردند.

د) تعیین MIC و MBC عصاره برگ *اویسنیا مارینا* بر روی سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی*

حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره برگ *اویسنیا مارینا* بر همه سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* مورد استفاده در این مطالعه ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی برگ *اویسنیا مارینا* بر سویه مرجع *اسینتوباکتر بومانی* ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که در این غلظت ۳۵۹ کلونی در هر میلی‌لیتر شمارش گردید که با توجه به تعداد اولیه باکتری، این غلظت موجب مهار رشد ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها گردیده است، در نتیجه غلظت مذکور به عنوان MBC در نظر گرفته شد و در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هیچ رشدی مشاهده نگردید. حداقل غلظت کشندگی برگ *اویسنیا مارینا* بر سویه‌های بالینی مقاوم به کارباپنم T4 و T5 برابر با ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که در این غلظت هیچ رشدی مشاهده نگردید. همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره، تعداد ۵۵۴ کلونی از سویه T2 و تعداد ۲۷۹ کلونی از سویه T3 بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار رشد کرد ولی از آنجا که غلظت مذکور موجب مهار ۹۹/۹ درصد رشد شده است. به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته می‌شود. در این مطالعه مقاوم‌ترین سویه نسبت به عصاره برگ *اویسنیا مارینا*، سویه بالینی T1 مقاوم به سفپیم بود که در ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر که بیشترین غلظت مورد استفاده در این مطالعه بود تعداد کلونی‌های ایجاد شده غیر قابل شمارش بود (جدول ۳).

[DOI: 10.29252/ismj.22.3.150]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:09 +0330 on Friday September 25th 2020

جدول ۳) تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) برگ *اویسنیا مارینا* بر سویه‌های *اسینتوباکتر بومانی*

Strain code		۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵
T1	MIC	C	C	C	T
	MBC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
T2	MIC	C	C	C	T
	MBC	۵۵۴	TNTC	TNTC	TNTC
T3	MIC	C	C	C	T
	MBC	۲۷۹	TNTC	TNTC	TNTC
T4	MIC	C	C	C	T
	MBC	NG	NG	TNTC	TNTC
T5	MIC	C	C	C	T
	MBC	NG	NG	TNTC	TNTC
ATCC 19606	MIC	C	C	C	T
	MBC	NG	NG	۹۰	۳۵۹

MBC به‌صورت واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی‌لیتر تعیین شده است. T: کدر (رشد قابل مشاهده)، C: شفاف (فاقد رشد قابل مشاهده)، TNTC: غیر قابل شمارش، NG: فاقد رشد.

بحث

گزارشات از خاصیت ضدمیکروبی گیاهان مانگرو از قسمت‌های مختلف دنیا در حال افزایش می‌باشد، به‌ویژه در دهه اخیر گیاهان مانگرو برای شناسایی ترکیبات فعال مورد غربالگری قرار گرفته‌اند و مشخص شده است که این گیاهان یک منبع زیستی بالقوه از ترکیبات داروهای جدید می‌باشند. تاکنون بیش از ۲۰۰ متابولیت فعال از گیاهان مانگرو مانند *اویسنیا مارینا* در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیری جدا شده است (۷). گیاهان مانگرو در طب سنتی برای درمان بیماری‌های زیادی مورد استفاده قرار می‌گیرند همچنین فعالیت ضدباکتریایی، ضدویروسی و ضدقارچی گیاهان مانگرو تأیید شده است (۸). افزایش روز افزون مقاومت در *اسینتوباکتر بومانی* یکی از چالش‌های درمان این باکتری می‌باشد.

مطالعات زیادی در ارتباط با بروز مقاومت‌های مختلف دارویی در ارتباط با گونه‌های *اسینتوباکتر* جدا شده از بیماران وجود دارد. در اکثر این موارد گونه غالب *اسینتوباکتر بومانی* بوده است (۹). مطالعات زیادی نشان داده‌اند که در اروپا، آمریکای شمالی، آرژانتین، برزیل، چین، هنگ‌کنگ، تایوان، ژاپن، کره و مناطقی از قسمت‌های جنوبی اقیانوس آرام *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از بیماران، دارای مقاومت میکروبی چند دارویی بوده است (۱۰).

در یک مطالعه مروری سیستماتیک که توسط مرادی و همکاران بر روی گزارشات مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گونه *اسینتوباکتر بومانی* جدا شده از مراکز درمانی مختلف در ایران انجام شده است مشخص شد که روند مقاومت چند دارویی در گونه‌های جدا شده اسینتوباکتر در ایران در حال افزایش بوده و تبدیل به یک معضل درمانی شده است (۱۱).

با توجه به اینکه یکی از راه‌های مقابله با پدیده مقاومت آنتی‌بیوتیکی استفاده از داروهای گیاهی به جای آنتی‌بیوتیک‌ها است، در مطالعه حاضر فعالیت ضدباکتریایی عصاره گلیسیرینه برگ گیاه *اویسنیا مارینا* بر سویه‌های بالینی مقاوم به سفپیم، سویه‌های بالینی مقاوم به کارباپنم و همچنین سویه مرجع *اسینتوباکتر بومانی* مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۴ سویه بالینی T2، T3، T4 و T5 مقاوم به کارباپنم بودند که آن‌ها نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده بجز کلیستین مقاوم بودند و سویه بالینی T1 نسبت به سفپیم نیمه حساس، نسبت به کلیستین، ایمی‌پنم و مروپنم حساس و نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی

[DOI: 10.29252/ismj.22.3.150]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:09 +0330 on Friday September 25th 2020

مقاوم بود. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره گلیسیرینه برگ گیاه *اویسنیا مارینا* بر سویه مرجع *اسینتوباکتر بومانی* و همچنین سویه‌های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بررسی حداقل غظت کشندگی عصاره گلیسیرینه برگ گیاه *اویسنیا مارینا* بر سویه مرجع ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، بر سویه‌های T4 و T5 مقاوم به کارباپنم ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و بر سویه‌های T3 و T4 مقاوم به کارباپنم ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. در غربالگری غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره بر سویه T1 مؤثر بود و هیچ رشدی مشاهده نشد ولی از آنجا که حداکثر غلظت مورد استفاده در تعیین MBC، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود، متأسفانه این غلظت نتوانست از رشد ۹۹/۹ درصد سویه بالینی T1 جلوگیری کند.

تمیزهاراسان (Thamizharasan) و همکاران اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی برگ *اویسنیا مارینا* با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر را بر *سودوموناس ایروژینوزا* را با روش آگار دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که میزان ۱۰۰ µl *اویسنیا مارینا* اثر ضدباکتریایی بیشتری در مقایسه با تتراسایکلین بر *سودوموناس ایروژنوزا* داشت و هاله عدم رشد آن‌ها به‌ترتیب ۲۱ و ۱۴ میلی‌متر گزارش شد (۱۲).

نتایج حاصل از مطالعه دوی (Devi) و همکاران نشان دادند که غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره متانولی *اویسنیا ماریا* به ترتیب بر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کلبسیلا پنومونیه*، *اشریشیاکلی* و *سودوموناس ایروژنوزا* مؤثر بوده است، قابل ذکر است که غلظت مورد استفاده آن‌ها ۱۰ برابر مطالعه حاضر بود (۱۳).

در تحقیقی که توسط شریف محمد و همکاران انجام شد، اثر ضدباکتری عصاره‌های اتانولی، متانولی، اتیل استات و استونی گیاه *اویسنیا مارینا* بر *پروتئوس ولگاریس* و *انتروباکتر کلوآکه* مورد ارزیابی قرار گرفت. از بین عصاره‌ها فقط عصاره متانولی دارای اثر ضدباکتریایی قابل مقایسه با جنتامایسن (کنترل مثبت) بود.

نتایج حاصل از مطالعات محققان نشان می‌دهد که مؤثرترین نوع عصاره مورد استفاده آن‌ها، عصاره متانولی بوده است. تنها مطالعه‌ای که در آن از عصاره گلیسیرینه برگ گیاه *اویسنیا مارینا* استفاده شده است، مطالعه تاج‌بخش و همکاران می‌باشد که بر روی سویه‌های گرم منفی مرجع *اشرشیاکلی و سودوموناس ایروژینوزا* انجام شده است (۱۴). حداقل غلظت کشندگی عصاره گلیسیرینه بر *اشرشیاکلی* و *سودوموناس ایروژنوزا* به‌ترتیب ۱۵/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۳۳/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که در غلظت‌های مذکور به‌ترتیب $۲x۱۰^{۲}$ واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی‌لیتر و ۸۰ واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی‌لیتر مشاهده گردید که موجب مهار ۹۹/۹ درصد رشد گردیده بود. در حالی‌که در مطالعه حاضر حداقل غلظت کشندگی بر سویه مرجع *اسینتوباکتر بومانی* ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که نسبت به غلظت مؤثر بر *سودوموناس ایروژنوزا* کمتر می‌باشد. متأسفانه مطالعات زیادی بر روی سویه بالینی *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به دارو انجام نشده است و در محدود مطالعات انجام شده نیز نتایج رضایت‌بخشی به‌دست نیامده است چنانچه در مطالعه قاسمی و همکاران اثر گیاه شنگ (*Tragopogon graminifolius*) بر سویه *اسینتوباکتر بومانی* مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج آن‌ها نشان داد که عصاره آبی گیاه شنگ اثر بسیار ضعیف و عصاره الکلی آن فاقد اثر ضدباکتریایی بر علیه *اسینتوباکتر بومانی* بود (۱۵).

[DOI: 10.29252/ismj.22.3.150]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:09 +0330 on Friday September 25th 2020

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر اولین ارزیابی اثر ضدباکتریایی برگ گیاه *اویسنیا مارینا* بومی ایران بر سویه بالینی *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به کارباپنم می‌باشد و نتایج حاصله نشان داد که عصاره گلیسرینه این گیاه اثر ضدباکتریایی قابل توجهی بر سوبه‌های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* مقاوم به کارباپنم دارد. در فاز بعدی مطالعه با استفاده از انواع روش‌های خالص‌سازی و با استفاده از حلال‌های مختلف، این عصاره خام خالص‌سازی شده و امید است بر اساس روش‌های شناسایی ترکیبات به یک یا چند ترکیب مؤثر با خاصیت ضدمیکروبی بر ضدسویه‌های *اسینتوباکتر بومانی* استاندارد و بیمارستانی، دست پیدا شود.

سپاس و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر به خاطر تأمین مالی این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Nordmann P. Acinetobacter Baumannii, the Nosocomial Pathogen Par Excellence. Pathol Biol (Paris) 2004; 6(52): 301-3.

2.Lin MF, Lan CY. Antimicrobial Resistance in Acinetobacter Baumannii: from Bench to Bedside. World J Clin Cases 2014; 2(12): 787.

3.Simor AE, Lee M, Vearncombe M, et al. An Outbreak Due to Multiresistant Acinetobacter Baumannii in a Burn Unit: Risk Factors for Acquisition and Management. Infect Control Hosp Epidemiol 2002; 23(5): 261-7.

4.Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Fernández-Cuenca F, et al. Risk-Factors for the Acquisition of Imipenem-Resistant Acinetobacter Baumannii in Spain: a Nationwide Study. Clin Microbiol Infect 2005; 11(11): 874-9.

5.Lee SO, Kim NJ, Choi SH, et al. Risk Factors for Acquisition of Imipenem-Resistant Acinetobacter Baumannii: A Case-Control Study. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(1): 224-8.

6.Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087. USA: 2018; 42-44.

7.Saad S, Taher M, Susanti D, et al. In Vitro Antimicrobial Activity of Mangrove Plant Sonneratia Alba. Asian Pac J Trop Biomed 2012; 2(6): 427-9.

8.Ravikumar S, Gnanadesigan M, Suganthi P, et al. Antibacterial Potential of Chosen Mangrove Plants Against Isolated Urinary Tract Infectious Bacterial Pathogens. Int J Med Med Sci 2010; 2(3): 94-9.

9.Villegas MV, Hartstein AI. Acinetobacter Outbreaks, 1977–2000. Infect Control Hosp Epidemiol 2003; 24(4): 284-95.

10.Perez F, Hujer AM, Hujer KM, et al. Global Challenge of Multidrug-Resistant Acinetobacter Baumannii. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(10): 3471-84.

11.Moradi J, Hashemi FB, Bahador A. Antibiotic Resistance of Acinetobacter baumannii in Iran: A Systemic Review of the Published Literature. Osong Public Health Res Perspect 2015; 6(2): 79-86.

12.Thamizharasan S, Saravanan NA. Antibacterial Potential of Mangrove Plant Avicennia Marina Against a Clinical Pathogen. Int J Zool St 2016; 1: 14-16.

13.Devi AS, Rajkumar J. In Vitro Antibacterial Activity and Stability of Avicennia Marina Against Urinary Tract Infection Pathogens At

Different Parameters. Pak J Biol Sci 2013; 16(19): 1034-9.

14.Ghasemi M, Habibi R, Sedighi M, et al. Invitro Investigating of Antibacterial Effect of Tragopogon Graminifolius DC Hydroalcoholic Extracts on Acinetobacter Baumannii. Iran J Infect Dis Trop Med 2017; 22(78): 41-5. (Persian)

15.Tajbakhsh S, Mahmoodpour M, Haghighi MA. Antibacterial Activity of Avicennia Marina Leaves Extract on Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli and Pseudomonas Aeruginosa. Iran South Med J 2005; 8(1): 1-7. (Persian)

[DOI: 10.29252/ismj.22.3.150]
Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:09 +0330 on Friday September 25th 2020

[DOI: 10.29252/ismj.22.3.150]

Downloaded from ismj.bpums.ac.ir at 11:09 +0330 on Friday September 25th 2020

Iran South Med J 2019; 22(3): 150-159

Original Article

Antibacterial Effect Leaf Extract of *Avicennia marina* on Standard and Clinical Strains of *Acinetobacter baumannii*

M. Mahmudpour (MD)[1*], A. Askari (MSc)[2], F. Yousefi (PhD)[2**]

[1] The Persian Gulf Tropical Medicine Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

[2] Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine,Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

(Received 13 Mar, 2019 Accepted 5 May, 2019)

Abstract

Background: *Acinetobacter baumannii* is an opportunistic pathogen and a nosocomial infection agent. Antibiotic resistance in this organism results in serious health problem such as treatment failure and increased mortality. Mangrove plants, especially *Avicennia marina*, are a potential bioresource for new drugs as they have been used in traditional medicine. This study aimed to investigate antibacterial effects of *A.marina* leaf extract on standard and clinical stains of *A.baumannii in vitro*.

Materials and Methods: *A.marina* leaves were dried in outdoor shade and ground. Then glycerin extract was provided at a concentration of 200 µg/ml and its antibacterial properties were assessed on standard strain and carbapenem-resistant clinical isolates of *A.baumannii* using agar well diffusion method. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) were determined.

Results: *A. marina* leaf extract had a significant antibacterial effect on all 6 strains at a concentration of 100 µL in agar well diffusion method. MIC_s were 25µg/ml in all strains. MBC_s were 12.5µg/ml in standard strains. The most resistant strain against the extract was cefepime-resistant clinical strain.

Conclusion: *A. marina* leaf crude extract had significant antibacterial effects on standard and carbapenem-resistant clinical isolates of *A. baumannii*.

Keywords: *Avicannia marina, Acinetobacter baumannii,* antibacterial effect, MIC, MBC.

©Iran South Med J.All right sreserved

Cite this article as: Mahmudpour M, Askari A, Yousefi F. Antibacterial Effect Leaf Extract of Avicennia marina on Standard and Clinical Strains of Acinetobacter baumannii. Iran South Med J 2019;22(3):150-159

Copyright © 2019 Mahmudpour, et al This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

***Address for correspondence:* Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine,Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran, Email: Forough.y@gmail.com

*ORCID: 0000-0002-9764-3322

**ORCID: 0000-0001-9342-4686

Website: http://bpums.ac.ir

Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir