DOI: 10.22122/jims.v35i463.9404 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ۴۶۳/هفته‌ی سوم اسفند ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۴

تعیین اثر عصاره‌ی اتانولی بره‌موم زنبور عسل بر جدایه‌های باکتریایی با مقاومت دارویی چندگانه‌ی شناسایی شده با روش مولکولی در زخم بیماران بستری در شهر اهواز

آیدا عیدی شیخ رباط[۱]، نفیسه‌سادات نقوی[۲]، وجیهه کرباسی‌زاده[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: مقاومت چندگانه‌ی دارویی، یکی از معضلات پزشکی در درمان زخم است. هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، شناسایی مولکولی جدایه‌های باکتریایی با مقاومت چندگانه به دارو در زخم بیماران بیمارستان‌های اهواز و تعیین اثر عصاره‌ی اتانولی بره‌موم زنبور عسل بر روی این باکتری‌ها بود.

روش‌ها: تعداد ۱۲۰ نمونه از اردیبهشت ماه تا تیر ماه ۱۳۹۵ از انواع زخم بیماران در پنج بیمارستان اهواز تهیه شد. جدایه‌های باکتریایی با مقاومت چندگانه‌ی دارویی با روش انتشار دیسک انتخاب شدند و با توالی‌یابی ژن 16SrRNA شناسایی گردیدند. عصاره‌ی اتانولی بره‌موم با روش خیساندن تهیه شد و اثر آن به عنوان یک عامل ضد باکتری بر روی جدایه‌ها با روش‌های انتشار از چاهک و Microdilution تعیین شد.

یافته‌ها: جدایه‌ها با مقاومت چندگانه شامل Escherichia coli، Pseudomonas aeruginosa، Acinetobacter baumannii، Staphylococcus aureus، Enterococcus faecalis و Enterococcus faecium از انواع زخم شناسایی و جدا شدند. غلظت ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی اتانولی بره‌موم در روش انتشار از چاهک بر جدایه‌های گرم مثبت مؤثر بود. در روش Microdilution، بیشترین حساسیت به عصاره در Staphylococcus aureus (با حداقل غلظت مهار کنندگی ۲۵ و حداقل غلظت کشندگی ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و پس از آن در Enterococcus faecalis و Enterococcus faecium (با حداقل غلظت مهار کنندگی ۱۰۰ و حداقل غلظت کشندگی ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مشاهده شد. باکتری‌های گرم منفی نسبت به همه‌ی غلظت‌های عصاره، مقاومت داشتند.

نتیجه‌گیری: باکتری‌های گرم مثبت مقاوم به چند دارو که به عنوان موامع درمان زخم شناخته شده‌اند، حساسیت بالایی به عصاره‌ی اتانولی بره‌موم زنبور عسل نشان دادند.

واژگان کلیدی: عفونت زخم، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بره‌موم، عامل ضد باکتری

ارجاع: عیدی شیخ رباط آیدا، نقوی نفیسه‌سادات، کرباسی‌زاده وجیهه. **تعیین اثر عصاره‌ی اتانولی بره‌موم زنبور عسل بر جدایه‌های باکتریایی با مقاومت دارویی چندگانه‌ی شناسایی شده با روش مولکولی در زخم بیماران بستری در شهر اهواز.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۶۳): ۱۹۴۸-۱۹۴۱

مقدمه

مقاومت چندگانه به دارو (Multiple drug resistance یا MDR) اغلب به مقاومت یک ارگانیسم به بیش از یک گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها اطلاق می‌شود. البته باکتری‌هایی که به یک گروه از داروهای خاص مقاومت دارند مانند Staphylococcus aureus مقاوم به متی‌سیلین، Enterococcus مقاوم به ونکومایسین و برخی باسیل‌های گرم منفی نیز در این گروه قرار می‌گیرند (۱). عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها که اغلب به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های دیگر هم مقاوم هستند، از جمله چالش‌های مهم در حال حاضر است. این مشکل، همه‌ی برنامه‌ریزی‌های درمانی را تحت تأثیر خود قرار داده است (۲).

بره‌موم (پروپلیس یا Propolis) فراورده‌ای از زنبور عسل (آپیس ملی‌فرا یا Apis mellifera) است که با مصرف صمغ درختان مختلفی نظیر کاج، صنوبر، تبریزی، چنار، گیلاس و آلبالو و پس از تغییرات آنزیمی و مخلوط شدن با گرده و موم، از غدد شکمی زنبورهای کارگر ترشح می‌شود (۳). دلیل استفاده از این صمغ، سود بردن از خواص ضد قارچی و ضد باکتریایی ترکیبات بیوفلاونوئیدی آن در حفاظت از کندو در مقابل بیماری‌ها و مهاجمان می‌باشد (۵-۴). ترکیب شیمیایی بره‌موم به شرایط اقلیمی و آب و هوایی، زمان جمع‌آوری و ویژگی‌های ژئوگرافیکی مختلف بستگی دارد. بیش از ۳۰۰ نوع ترکیب شیمیایی در بره‌موم وجود دارد که از آن جمله،

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
۳- استادیار، گروه باکتری و ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: نفیسه‌سادات نقوی
Email: naghavi@iaufala.ac.ir

می توان بـه اسـیدهای آلیفاتیـک و آروماتیـک، اسـترها، فلاونوئیـدها، قندها، گلیسرول، اسید فسفریک، وانیلـین، میریسـتین و ویتـامین هـای مختلفـی نظیـر تیـامین، ریبـوفلاوین، نیاسـین، پانتوتنیـک اسـید و پیریدوکسـین اشـاره کـرد (۷-۶). هـدف از انجـام مطالعـه‌ی حاضـر، شناسایی مولکولی انواع دارای مقاومت چندگانـه‌ی دارویـی در زخـم بیماران بستری شده در بیمارسـتان‌هـای شـهر اهـواز و بررسـی تـأثیر عصاره‌ی اتانولی برەموم در کنترل رشد این باکتری‌ها بود.

روش‌ها

نمونه‌گیری: با رعایت مـوازین اخـلاق پـژوهش و اجـازه از بیمـاران، تعداد ۱۲۰ نمونـه از زخـم بیمـاران بسـتری در بیمارسـتان‌هـای امـام خمینـی، امیرالمـؤمنین (ع)، گلسـتان، امیرکبیـر و سـوانح سـوختگی طالقانی اهواز، از اردیبهشت تا تیـر سـال ۱۳۹۵ جمـع‌آوری شـد. هـر نمونه به محیط‌هـای کشـت مـایع Tripticase soy broth (TSB) و Brain Heart Infussion Agar (BHI) (BHI) و جامـد Blood agar (BA) و Eosin methylen blue agar (EMBA) تلقیح شد و به مـدت ۲۴ سـاعت در دمـای ۳۷ درجـه‌ی سـانتی‌گـراد انکوبه گردید (۸).

شناسایی باکتری‌ها: پس از بررسی خصوصیات ظـاهری کلنـی و میکروسکوپی هـر بـاکتری، از روش‌هـای بیوشـیمیایی معمـول ماننـد کاتـالاز، اکسـیداز، IMViC، هیـدرولیز اوره، دکربوکسیلاسـیون آمینواسیدها و تخمیر قندها بـرای باسـیل‌هـای گـرم منفـی و کاتـالاز، کواگولاز، اکسیداز، فسـفاتاز، هیـدرولیز DNA، رشـد در ۶/۵ درصـد NaCl و تخمیر قندها برای کوکسی‌های گرم مثبت اسـتفاده شـد (۸). گونه‌ی باکتری‌هـا بـا روش مولکـولی از طریـق تکثیـر و تـوالی‌یـابی قطعه‌ای از ژن 16SrRNA شناسایی گردید. بـه ایـن منظـور، پـس از استخراج DNA (با اسـتفاده از کیـت سـیناژن بـا شـماره‌ی کاتـالوگ DN 8115C)، بـا اسـتفاده از پرایمرهـای عمـومی RW01 (5´-AAC TGG AGG AAG GTG GGG AT-3´) و DG74 (5´-AAC TGG AGG AAG GTG GGG AT-3´) بـا دمـای ذوب ۵۲ درجـه‌ی سـانتی‌گـراد (۹) واکـنش زنجیـره‌ی پلیمـراز هدف‌گذاری شده (Touch down polymerase chain reaction یا Touch down PCR) اجرا گردید.

برنامه‌ی دمایی و زمانی به صورت تـک رشـته‌ای شـدن اولیـه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، سپس ۵ چرخه‌ی اولیـه با برنامه‌ی ۹۴ درجه‌ی سـانتی‌گـراد بـه مـدت ۶۰ ثانیـه، ۵۸ درجـه‌ی سانتی‌گراد بـه مـدت ۵۰ ثانیـه و ۷۲ درجـه‌ی سـانتی‌گـراد بـه مـدت ۶۰ ثانیه و در نهایـت، ۳۵ چرخـه‌ی نهـایی بـا برنامـه‌ی ۹۴ درجـه‌ی سانتی‌گراد به مـدت ۶۰ ثانیـه، ۵۶/۵ درجـه‌ی سـانتی‌گـراد بـه مـدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیـه اجـرا شـد. بـرای بررسی کیفی محصول PCR، از الکتروفورز محصول PCR شـده بـر روی ژل آگارز یک درصد اسـتفاده شـد. محصـولات PCR قطعـات تکثیر شده در شرکت Bioneer کره‌ی جنوبی توالی‌یابی شد. با انطباق توالی‌ها در بانک ژنی، گونه‌ی باکتری‌ها تأیید گردید.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی: ایـن آزمـایش بـا روش انتشـار از دیسک در آگار بر اساس جـداول مؤسسـه‌ی اسـتانداردهای بـالینی و آزمایشگاهی (Clinical and Laboratory Standards Institute یـا CLSI) و به روش Kirby–Bauer انجام شد. رشد باکتری‌های کشت یافته بر روی محیط کشت حاوی دیسک‌های آنتی‌بیوتیـک پـس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد ارزیابی شد (۸).

تکثیر ژن‌های مقاومت: جهت ردیابی ژن مقاومت بـه متـی‌سـیلین (mecA) در Staphylococcus aureus جفت پرایمرهای اختصاصی بـا تـوالی‌هـای 5´-TGGCTATCGTGTCACAAT CG-3´ و 5´-CTGGAACTTGTT GAG CAG AG -3´ بـا دماهـای ذوب به ترتیب ۵۳ و ۵۴ درجه‌ی سانتی‌گراد مورد استفاده قرار گرفت (۱۰). برنامه‌ی دمایی و زمانی به صورت تک رشته‌ای شـدن اولیـه در دمـای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه بـا برنامـه‌ی ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۲ درجه‌ی سـانتی‌گـراد بـه مدت ۵۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه و در نهایت، گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شـد. جهـت ردیـابی ژن مقاومـت بـه ونکومایسـین (vanA) در Enterococcus faecium جفـت پرایمرهـای اختصاصـی بـا تـوالی‌هـای 5´-CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA-3´ و 5´-CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA-3´ با دمای ذوب ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد برای شناسایی ژن vanA مورد استفاده قرار گرفـت (۱۱). برنامه‌ی دمایی و زمـانی بـه صـورت تـک رشـته‌ای شـدن اولیـه در دمای۹۵ درجه‌ی سانتی‌گـراد بـه مـدت ۴ دقیقـه، ۳۰ چرخـه بـا برنامـه‌ی ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۴ درجه‌ی سانتی‌گراد بـه مـدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد بـه مـدت ۱ دقیقـه و در نهایـت گسـترش نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقـه انجـام شـد. بـرای بررسی کیفی محصول PCR، از الکتروفورز محصول PCR شده بـر روی ژل آگارز یک درصد استفاده شد.

تهیه‌ی عصاره‌ی اتانولی برەموم زنبور عسل: برەمـوم از تعـاونی زنبورداران استان خوزستان تهیه شد. برای تهیه‌ی عصاره‌ی اتـانولی، از روش خیساندن استفاده گردید. ابتدا مخلوط ۲۵ درصد وزنی بـرەمـوم در اتانول ۹۶ درصد تهیه گردیـد و بـه مـدت ۷۲ سـاعت بـا سـرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه‌ی سـانتی‌گـراد تکـان داده شـد. سپس، به مدت ۱۴ روز در مکان ثابت در دمای اتاق نگهداری شد. در

نهایت، عصاره با استفاده از کاغذ صافی Whatman شماره‌ی ۱ صاف گردید و برای تبخیر الکل، به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تا خشک شدن کامل قرار گرفت (۱۲).

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌ی برهموم: غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی اتانولی با استفاده از محلول توئین ۲۰ درصد تهیه گردید و فعالیت ضد میکروبی آن بر اساس روش‌های انتشار چاهک و Microdilution تعیین شد. در روش انتشار چاهک با انتهای پیپت پاستور استریل بر روی محیط کشت Muller-Hinton broth (MHB) با فاصله‌ی ۳ سانتی‌متر، چاهک زده شد و عمق چاهک‌ها با محیط کشت مذاب بسته شد. باکتری مورد آزمایش با سوسپانسیون حاوی 10^7 سلول در هر میلی‌لیتر تهیه شد و به کمک سوآب استریل روی پلیت‌های چاهک زده به صورت چمنی کشت داده شد. از هر غلظت عصاره، ۱۰۰ میکرولیتر درون چاهک ریخته شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، قطر هاله‌های عدم رشد با استفاده از خط‌کش آنتی‌بیوگرام اندازه‌گیری شد. محلول توئین ۲۰ درصد به عنوان شاهد منفی و ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک‌های سفالکسین و سیپروفلوکسازین به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید.

در روش Microdilution، عصاره‌ی اتانولی برهموم همراه با سوسپانسیون باکتری با تعداد 10^7 سلول در میلی‌لیتر در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ی ته‌گرد U شکل درب‌دار استریل ریخته شد تا سری غلظت‌های ۱۲/۵ ، ۲۵ ، ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره، در حجم کلی ۲۰۰ میکرولیتر در چاهک‌ها به دست آید. در چاهک شاهد مثبت، محیط کشت MHB به جای عصاره و در چاهک شاهد منفی ۲۰۰ میکرولیتر توئین ۲۰ درصد ریخته شد. میزان جذب نوری چاهک‌های میکروپلیت در دستگاه خوانش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد.

سپس، میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد و دوباره میزان جذب نوری ایجاد شده در همان طول موج بررسی گردید. با مقایسه‌ی میزان جذب نوری هر یک از چاهک‌ها قبل و بعد از انکوباسیون، کمترین غلظت عصاره که در چاهک مربوط به آن کدورتی مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (Minimum inhibitory concentration یا MIC) در نظر گرفته شد. به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی (Minimum bactericidal concentration یا MBC) عصاره، از چاهک‌های مربوط به MIC و سه چاهک مربوط به غلظت‌های بیشتر که فاقد کدورت قابل تشخیص بودند، با استفاده از سواب استریل بر روی محیط کشت Mueller-Hinton agar (MHA) به صورت خطی کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت.

غلظتی از عصاره‌ی مورد آزمایش که بر روی محیط کشت جامد مربوط به آن هیچ گونه رشدی از باکتری‌های مورد آزمایش مشاهده نشد، به عنوان MBC در نظر گرفته شد. به منظور تأیید نتایج آزمایش، هر نمونه ۳ بار تکرار شد و میانگین تکرارها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۱ (version 21, IBM Corporation, Armonk, NY) محاسبه و ثبت گردید (۱۴-۱۳).

یافته‌ها

جدایه‌ها: از مجموع ۱۲۰ نمونه‌ی زخم، ۷۵ مورد مربوط به زخم بستر، ۲۵ مورد مربوط به زخم پای دیابتی و ۲۰ مورد مربوط به زخم سوختگی بودند. از مجموع نمونه‌ها، ۲۵ جدایه‌ی مقاوم به آنتی‌بیوتیک با آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی گردید که ۶ جدایه از میان آن‌ها دارای مقاومت چندگانه (Multiple drug resistance یا MDR) بودند. نتیجه‌ی الکتروفورز محصولات PCR نشان دهنده‌ی تکثیر قطعه‌ی ۳۷۰ جفت بازی در ژن 16SrRNA بود (شکل ۱). توالی‌یابی محصولات PCR تأیید کننده‌ی ۶ گونه‌ی متعلق به جنس‌های شناسایی شده با آزمون‌های بیوشیمیایی بود. این گونه‌ها، شامل Escherichia coli، Pseudomonas aeruginosa، Acinetobacter baumannii، Staphylococcus aureus، Enterococcus faecalis و Enterococcus faecium با مشابهت توالی ۹۹-۹۷ درصد بودند (جدول ۱).

جدول ۱. اطلاعات مربوط به نمونه‌ها و باکتری‌های جداسازی شده

نوع زخم	تعداد نمونه‌ها	جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک	جدایه‌های MDR
بستر	۷۵	۵ جدایه‌ی Enterococcus faecalis، ۳ جدایه‌ی Enterococcus faecium، ۲ جدایه‌ی Staphylococcus aureus، ۲ جدایه‌ی Escherichia coli و ۱ جدایه‌ی Acinetobacter baumannii	یک جدایه‌ی Enterococcus faecalis، یک جدایه‌ی Enterococcus faecium و یک جدایه‌ی Acinetobacter baumannii
پای دیابتی	۲۵	۵ جدایه‌ی Escherichia coli، ۳ جدایه‌ی Staphylococcus aureus	یک جدایه‌ی Escherichia coli و یک جدایه‌ی Staphylococcus aureus
سوختگی	۲۰	۴ جدایه‌ی Pseudomonas aeruginosa	یک جدایه‌ی Pseudomonas aeruginosa

MDR: Multi drug resistant

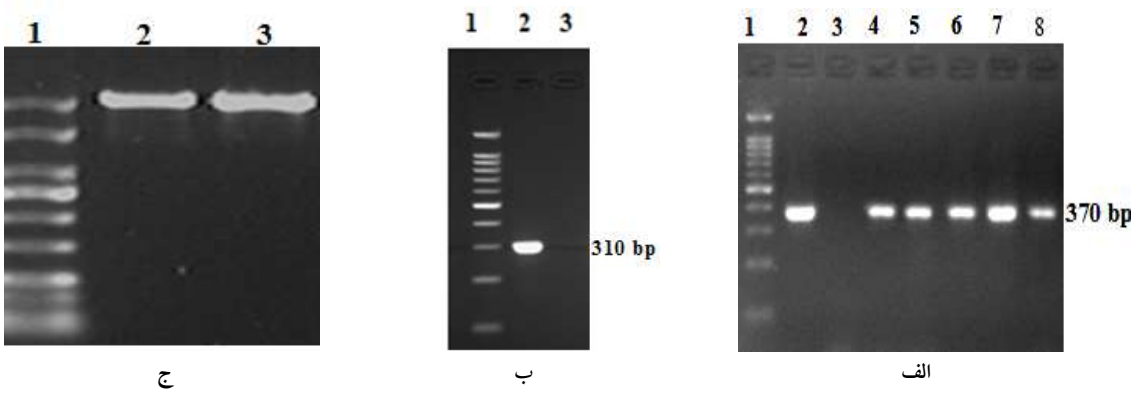
جدول ۲. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جداسازی شده

نوع آنتی‌بیوتیک	Escherichia coli	Pseudomonas aeruginosa	Acinetobacter baumannii	Staphylococcus aureus	Enterococcus faecalis	Enterococcus faecium
سیپروفلوکساسین	R	R	R	R	S	R
سفوکسیتین	R	S	R	R	S	R
سفوتاکسیم	R	R	S	S	S	S
سفتریاکسون	S	R	S	S	S	S
نالیدیکسیک اسید	R	S	R	S	S	S
جنتامایسین	R	S	R	R	S	R
اریترومایسین	S	S	S	R	S	S
توبرامایسین	S	R	S	S	S	S
ایمی‌پنم	R	R	R	S	S	S
مروپنم	R	R	R	S	S	S
آمپی‌سیلین	S	S	S	R	R	R
متی‌سیلین	S	S	S	R	S	S
آمیکاسین	S	R	S	S	S	S
کاربنی‌سیلین	S	R	S	S	S	S
پیپراسیلین	S	R	S	S	S	S
داکسی‌سیلین	S	S	S	R	R	R
ونکومایسین	S	S	S	S	S	R

R: مقاوم، S: حساس

مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها در جدول ۲ مشاهده می‌شود. تکثیر ژن mecA در Staphylococcus aureus نشان دهنده‌ی مقاومت این جدایه به متی‌سیلین و تکثیر ژن vanA در Enterococcus faecium نشان دهنده‌ی مقاومت این جدایه به ونکومایسین بود (شکل ۱).

اثر ضد میکروبی عصاره‌ی برهموم: میانگین نتایج به دست آمده از چهار تکرار قطر هاله‌های عدم رشد در روش انتشار از چاهک در جدول ۳ آمده است. نتایج نشان داد که عصاره‌ی برهموم بر باکتری‌های گرم مثبت مورد مطالعه به خصوص Staphylococcus aureus مقاوم به متی‌سیلین و Enterococcus faecium مقاوم به ونکومایسین تأثیر داشت؛ اگر چه بر روی باکتری‌های گرم منفی تأثیری نداشت.



ج ب الف

شکل ۱. نتیجه‌ی الکتروفورز ژل آگارز محصولات Polymerase chain reaction (PCR). الف: محصول ۳۷۰ جفت بازی در ژن 16SrRNA. ۱: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، ۲: Escherichia coli، ۳: شاهد منفی، ۴-۶ به ترتیب: Pseudomonas، Acinetobacter، Staphylococcus، ۷ و ۸: دو جدایه‌ی Enterococcus. ب: محصول ۳۱۰ جفت بازی ژن *mecA*. ۱: نشانگر ۱۰۰۰-۱۰۰ جفت بازی، ۲: Staphylococcus aureus، ۳: شاهد منفی. ج: محصول ۱۰۳۰ جفت بازی ژن *vanA*. ۱: نشانگر ۱۰۰۰-۱۰۰ جفت بازی، ۲: شاهد مثبت (ATCC 51559 Enterococcus faecium)، ۳: Enterococcus faecium

جدول ۳. میانگین قطر هاله‌های عدم رشد و مقادیر حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum inhibitory concentration یا MIC) و کشندگی (Minimum bactericidal concentration یا MBC) برای غلظت‌های مختلف عصاره‌ی برەموم بر روی سویه‌های مورد مطالعه

باکتری	غلظت عصاره (میلی گرم در میلی‌لیتر)					MIC	MBC
	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	(mg ml^{-1})	(mg ml^{-1})
Escherichia coli	–	–	–	–	–	–	–
Pseudomonas aeruginosa	–	–	-	۹/۳۳ ± ۱/۱۵	۱۱/۳۳ ± ۲/۰۸	–	–
Acinetobacter baumannii	–	–	–	–	-	–	–
Staphylococcus aureus	۱۰/۶۷ ± ۰/۵۸	۱۱/۰۰ ± ۱/۱۵	۱۳/۷۵ ± ۲/۲۲	۱۶/۵۰ ± ۱/۲۹	۱۸/۰۰ ± ۰/۸۲	۲۵	۵۰
Enterococcus faecalis	–	۱۱/۲۵ ± ۲/۳۶	۱۳/۲۵ ± ۰/۹۶	۱۴/۲۵ ± ۰/۹۶	۱۶/۵ ± ۰/۵۸	۱۰۰	۲۰۰
Enterococcus faecium		–	–	۱۰/۲۵ ± ۰/۵۰	۱۲/۷۵ ± ۰/۹۶	۱۰۰	۲۰۰

MIC: Minimum inhibitory concentration; MBC: Minimum bactericidal concentration

نتایج MIC و MBC بر باکتری‌هایی که در روش چاهک به عصاره حساسیت نشان دادند نیز در جدول ۲ مشاهده می‌شود. بیشترین حساسیت در Staphylococcus aureus و پس از آن گونه‌های Enterococcus مشاهده گردید. در این آزمایش، Pseudomonas aeruginosa با وجود نتیجه‌ی به دست آمده در روش انتشار از چاهک، نسبت به عصاره‌ی اتانولی برەموم مقاومت نشان داد.

بحث

راهکارهایی برای درمان این عفونت‌ها به خصوص انواع مقاوم به آنتی‌بیوتیک، مانند درمان ترکیبی سولفادیازین و نقره ارایه و در دنیا و ایران پیشنهاد شده است (۱۶-۱۵)، اما نکته‌ی مهم، اثرات سایتوتوکسیک احتمالی این روش‌های درمانی است که باید مورد توجه قرار گیرد (۱۷). بنابراین ارایه‌ی راهکارهای درمانی با استفاده از ترکیبات طبیعی، ضروری به نظر می‌رسد. باکتری‌های جداسازی شده و شناسایی شده در بررسی حاضر شامل سویه‌هایی از Escherichia coli، Pseudomonas aeruginosa، Acinetobacter baumannii، Staphylococcus aureus، Enterococcus faecalis و Enterococcus faecium بودند. این باکتری‌ها که مقاومت به نسبت بالایی به آنتی‌بیوتیک ها نشان دادند، از جمله گونه‌هایی هستند که عامل عفونت‌های بیمارستانی نظیر عفونت زخم می‌باشند (۱۸). دستاورد مهم پژوهش حاضر، تأثیر قابل توجه عصاره‌ی اتانولی برەموم بر روی Staphylococcus aureus مقاوم به متی‌سیلین و Enterococcus faecium مقاوم به ونکومایسین بود؛ به طوری که در روش Microdilution، بیشترین حساسیت به عصاره در Staphylococcus aureus (با حداقل غلظت مهار کنندگی ۲۵ و حداقل غلظت کشندگی ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و پس از آن در Enterococcus faecalis و Enterococcus faecium (با حداقل غلظت مهار کنندگی ۱۰۰ و حداقل غلظت کشندگی ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مشاهده شد. همچنین، شناسایی باکتری‌های گرم منفی مقاوم به آنتی‌بیوتیک که نسبت به عصاره‌ی برەموم مقاومت نشان دادند، با توجه به تغییراتی که در فراوانی عفونت‌های سوختگی به سمت افزایش انواع گرم منفی مشاهده شده است (۱۹)، اهمیت توجه به روش‌های درمانی نوین برای کنترل این عوامل در عفونت‌های زخم را نشان می‌دهد.

اثر ضد میکروبی برەموم زنبور عسل در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است (۲۴-۲۰، ۴)، اما تحقیقات محدودی بر روی اثر برەموم زنبور عسل بر روی باکتری‌های جداسازی شده از زخم به خصوص انواع مقاوم به آنتی‌بیوتیک انجام شده است که به آن‌ها اشاره می‌شود. Goldstein و همکاران، تأثیر عصاره‌ی اتانولی برەموم بر رشد انواع باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت و مخمرها، از جمله باکتری‌های ایجاد کننده‌ی بالقوه عفونت زخم را مورد بررسی قرار دادند. عصاره‌ی اتانولی برەموم، علیه Staphylococcus aureus با MIC معادل ۲۱/۴۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و علیه Staphylococcus epidermidis با MIC معادل ۱۷/۸۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مؤثر بود. عصاره‌ی اتانولی برەموم علیه باکتری‌های گرم منفی Escherichia coli و Pseudomonas aeruginosa و مخمر Candida albicans فعالیت ضد میکروبی نشان نداد (۲۵).

Lotfy و همکاران، در یک مطالعه‌ی موردی، اثر ترکیبی عسل، برەموم و نوعی صمغ را بر روی زخم دیابتی مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد میزان بوی زخم کاهش یافته بود و زخم طی بهبود، دچار عفونت نشد. ایشان تأکید کردند مطالعات کامل‌تری در زمینه‌ی تأثیر این ترکیبات برای درمان عفونت های ناشی از زخم لازم است (۲۶). Wojtyczka و همکاران، با استفاده از عصاره‌ی اتانولی برەموم مناطق لهستان تشکیل بیوفیلم توسط باکتری را با استفاده از غلظت‌های ۰/۳۹۰-۰/۰۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره متوقف کردند (۲۷). نتایج بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی برەموم بر روی باکتری‌های جداسازی شده در بررسی حاضر نشان داد که غلظت

۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره در روش انتشار از چاهک بر روی باکتری‌های گرم مثبت مورد مطالعه با قطر هاله‌های بیش از ۱۰ میلی‌متر مؤثر بود، اما بر روی باکتری‌های گرم منفی تأثیری نداشت.

نکته‌ی قابل تأمل دیگر که از مقایسه‌ی نتایج این بررسی و سایر پژوهش‌های مرتبط استنباط می‌شود، تفاوت‌هایی در نتایج حاصل از غلظت‌های مؤثر برەموم در مطالعات مختلف است که می‌تواند به دلیل تنوع نسبی ترکیبات ضد میکروبی موجود در برەموم تهیه شده در انواع منابع جغرافیایی باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر اساس نتایج پایان‌نامه‌ی دانشجویی دوره‌ی کارشناسی ارشد با شماره‌ی ۱۷۲۳۰۵۰۷۹۴۱۰۱۹ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان تهیه شده است. از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به دلیل در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی و ریاست محترم بیمارستان‌های اهواز به خاطر همکاری در تهیه‌ی نمونه‌های بالینی قدردانی می‌گردد.

References

1. Smith PW, Bennett G, Bradley S, Drinka P, Lautenbach E, Marx J, et al. SHEA/APIC guideline: Infection prevention and control in the long-term care facility, July 2008. Infect Control Hosp Epidemiol 2008; 29(9): 785-814.
2. Elbossaty WF. Antibiotic drugs and multidrug resistance bacteria. Int J Pub Health Safe 2017; 2: 131.
3. Sforcin JM. Biological properties and therapeutic applications of propolis. Phytother Res 2016; 30(6): 894-905.
4. Arul Selvan K, Prabhu T. Extraction of propolis from beehives and characterization of its constituents and medicinal properties: a review. International Journal of Advanced Engineering Technology 2010; 1(3): 50-3.
5. Bobany DM, Martins RRC. Antimicrobial natural products: Apitherapy. In: Mendez-Vilas A, editor. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Badajoz, Spain: Formatex Research Center; 2013. p. 940-5.
6. Danert FC, Zampini C, Ordonez R, Maldonado L, Bedascarrasbure E, Isla MI. Nutritional and functional properties of aqueous and hydroalcoholic extracts from Argentinean propolis. Nat Prod Commun 2014; 9(2): 167-70.
7. Ownagh A, Tukmechi A, Adibhesam M, Ebrahimzadeh S. Comparative study on the effect of ethanol extract of propolis collected from west Azarbaijan apiaries against dermatophytes and non-dermatophytes fungi. J Urmia Univ Med Sci 2010; 21(3): 206-14. [In Persian].
8. Brooks G, Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz, Melnick and Adelbergs medical microbiology. 26th ed. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2012.
9. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1994; 32(2): 335-51.
10. Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G, et al. Specific detection of methicillin-resistant Staphylococcus species by multiplex PCR. J Clin Microbiol 1995; 33(11): 2864-7.
11. Daghighi Z, Tajbakhsh S, Goudarzi H, Karimi A, Nateghian A. et al. Molecular detection of vanA and vanB genes in vancomycin-resistant enterococcus isolated by polymerase chain reaction from the intestines of children admitted to the intensive care units. Arch Pediatr Infect Dis 2014 ;2(4):e18414.
12. Dagostin S, Formolo T, Giovannini O, Pertot I, Schmitt A. Salvia officinalis extract can protect grapevine against Plasmopara viticola. Plant Disease 2010; 94(5): 575-80.
13. Mokale Kognou AL, Ngono Ngane RA, Kuiate JR, Koanga Mogtomo ML, Tchinda TA, Mouokeu RS, et al. Antibacterial and antioxidant properties of the methanolic extract of the stem bark of Pteleopsis hylodendron (Combretaceae). Chemother Res Pract 2011; 2011: 218750.
14. Attalla M, Owayss A, Mohanny M. Antibacterial activities of bee venom, propolis, and royal jelly produced by three honey bee, Apis mellifera L., hybrids reared in the same environmental conditions. Annals of Agricultural Science, Moshtohor 2007; 45: 895-902.
15. Seyyedmir MR, Soltani HR, Akhoondi Meybodi H, Morshedi A, Fakhri E. Effects of nanosilver dressing on wounds created in rats. J Isfahan Med Sch 2012; 29(164): 2073-8. [In Persian].
16. Hendizadeh Z S, pourabasi M S, Mirsane S A, Gilasi H. The efficacy of silver dressings in prevention of wound bacterial and fungal infection in skin surgery sternum area in open-heart surgery in Kashan Shahid Beheshti hospital . Zanko J Med Sci. 2016; 17(53): 21-30. [In Persian].
17. Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN, Dibo SA. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. Burns 2007; 33(2): 139-48.
18. Ki V, Rotstein C. Bacterial skin and soft tissue infections in adults: A review of their epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and site of care. Can J Infect Dis Med Microbiol 2008; 19(2): 173-84.
19. Jafari R, Karbasizade V, Moghim Sh. Frequency and resistance patterns of bacterial isolates from burn wounds infections in Isfahan, Iran. J Isfahan Med Sch 2013; 31(246): 1134-40. [In Persian].
20. Yaghoubi MJ, Ghorbani G, Soleimanian-Zad S, Satari R. Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition. DARU J Pharm Sci 2007; 15(1): 45-8.
21. Hendi NKK, Naher HS, Al-Charrakh AH. In vitro antibacterial and antifungal activity of Iraqi propolis.

J Med Plants Res 2011; 5(20): 5058-66.
22. Elbaz GA, Elsayad II. Comparison of the antimicrobial effect of Egyptian propolis vs New Zealand propolis on Streptococcus mutans and lactobacilli in saliva. Oral Health Prev Dent 2012; 10(2): 155-60.
23. Chamandi G, Olama Z and Holail H. Antimicrobial effect of propolis from different geographic origins in Lebanon. Int J Curr Microbiol App Sci 2015; 4(4): 32842.
24. Akca AE, Akca G, Topcu FT, Pikdoken ME, Ozgen IS. the comparative evaluation of the antimicrobial effect of propolis with chlorhexidine against oral pathogens: an in vitro study. Biomed Res Int. 2016; 2016: 3627463.
25. Goldstein EJ, Citron DM, Nesbit CA. Diabetic foot infections. Bacteriology and activity of 10 oral antimicrobial agents against bacteria isolated from consecutive cases. Diabetes Care 1996; 19(6): 638-41.
26. Lotfy M, Badra G, Burham W, Alenzi FQ. Combined use of honey, bee propolis and myrrh in healing a deep, infected wound in a patient with diabetes mellitus. Br J Biomed Sci 2006; 63(4): 171-3.
27. Wojtyczka RD, Kepa M, Idzik D, Kubina R, Kabala-Dzik A, Dziedzic A, et al. In vitro antimicrobial activity of ethanolic extract of Polish propolis against biofilm forming Staphylococcus epidermidis strains. Evid Based Complement Alternat Med 2013; 2013: 590703.

DOI: 10.22122/jims.v35i463.9404 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School Received: 31.12.2017

Vol. 35, No. 463, 3rd Week, March 2018 Accepted: 03.02.2017

Detection of the Effect of Bee Propolis Ethanol Extract against Molecularly Identified Multiple-Drug Resistant Bacterial Isolates in Wounds of Hospitalized Patients in Ahvaz City, Iran

Aida Eidi-Sheikhrobat[1], Nafiseh Sadat Naghavi[2], Vajiheh Karbasizadeh[3]

Original Article

Abstract

Background: Multiple-drug resistance (MDR) is one of the medical challenges in medicine. The aim of present study was molecular identification of multiple-drug resistant bacterial isolates in wounds of patients in Ahvaz City, Iran, hospitals, and detection of the effect of bee propolis ethanol extract on these bacteria.

Methods: 120 samples was obtained from bed, burn, and diabetic foot wounds of patients hospitalized in 5 hospitals in Ahwaz City from May to July 2016. Multiple-drug resistant isolates were selected using disk diffusion method and were identified via sequencing 16SrRNA gene. Propolis ethanol extract was prepared using soaking method and its effect as an antibacterial agent was tested on the isolates by well diffusion and microdilution methods.

Findings: 6 multiple-drug resistant isolates including Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecium, and Enterococcus faecalis were identified among 25 antibiotic-resistant isolates from different wounds. The concentration of 25 mg/ml of propolis ethanol extract was effective on Gram-positive bacteria in well diffusion method. In microdilution method, the most sensitivity was seen in Staphylococcus aureus with minimum inhibitory concentration (MIC) of 25 mg/ml and minimum bactericidal concentration (MBC) of 50 mg/ml, and then in Enterococcus faecium, and Enterococcus faecalis minimum inhibitory concentration of 100 mg/ml and minimum bactericidal concentration of 200 mg/ml. Gram-negative bacteria were resistant to all concentrations of extract in both methods.

Conclusion: The isolated multiple-drug resistant Gram-positive bacteria which were from problematic agents in treatment of wounds, showed high sensitivity to propolis ethanolic extract.

Keywords: Wound infection, Antibiotic resistance, Propolis, Antibacterial agent

Citation: Eidi-Sheikhrobat A, Naghavi NS, Karbasizadeh V. **Detection of the Effect of Bee Propolis Ethanol Extract against Molecularly Identified Multiple-Drug Resistant Bacterial Isolates in Wounds of Hospitalized Patients in Ahvaz City, Iran.** J Isfahan Med Sch 2018; 35(463): 1941-8.

1- Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
3- Assistant professor, Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Nafiseh Sadat Naghavi, Email: naghavi@iaufala.ac.ir