

بررسی اثرات ضد میکروبی کرم گیاهی دکتر کامکار بر روی سویه‌های مختلف میکروبی بیمارها در شرایط آزمایشگاهی

تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۲/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۵/۵

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از گیاهان دارویی به منظور تولید داروهای گیاهی بدلیل دارا بودن خواص ضد میکروبی یکی از مهمترین موارد مصرف در درمان عفونتها بویژه در زخم‌ها می‌باشد. افزایش مقاومت میکروبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و عوارض جانبی ناشی از مصرف آنها، باعث گسترش تحقیقات در زمینه گیاهان دارویی بعنوان درمانهای جایگزین در سال های اخیر بوده است. از اینرو هدف از اجرای این تحقیق بررسی اثرات ضد میکروبی کرم گیاهی دکتر کامکار بر روی سویه‌های مختلف میکروبی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: اثرات ضدمیکروبی کرم گیاهی با استفاده از روشهای مختلف چاهک گذاری، تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) بر روی ۱۱ میکروارگانیزم شامل ۵ سویه استاندارد که برای تعیین اثرات ضد میکروبی استفاده می‌شوند و بقیه سویه‌های بالینی جدا شده از زخمهای عفونی در بیمارها بودند، انجام شد. تعیین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های متداول با استفاده از روش Kirby & Bauer براساس استاندارد CLSI (2018) بر روی این سویه‌های میکروبی انجام گردید.

یافته‌ها: کرم نسبت به ۱۰ سویه مورد بررسی دارای اثرات ضد میکروبی بود و تنها ۱ سویه نسبت به کرم مقاومت نشان داد. در بین سویه‌های میکروبی باسیلوس سوبیتی لیس با قطر عدم هاله رشد (31mm) دارای بیشترین حساسیت و بعد از آن بترتیب باسیلوس آنتراسیس (25mm)، اسیتوباکتر بومانی (22mm)، استافیلوکوکوس ارئوس (22mm)، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس (20mm)، باسیلوس سرئوس (16mm)، استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی سیلین (14mm)، سودوموناس آئروژینوزا (14mm)، استرپتوکوکوس پایورنز (12mm) و کاندیدا آلبیکنس (12mm) و به اشرفیا کلی فاقد اثر ضد میکروبی بود.

نتایج MIC نشان داد که کرم گیاهی بیشترین تأثیر را نسبت به باسیلوس سرئوس و کمترین را به استرپتوکوکوس پایورنز و کاندیدا آلبیکنس داشت در حالیکه نتایج MBC حاکی از آن بود که بیشترین تأثیر بر روی باسیلوس سرئوس و کمترین در سودوموناس آئروژینوزا مشاهده شد. نتایج آنتی بیوگرام حاکی از وجود مقاومت چندین آنتی بیوتیک در سویه‌های مورد بررسی بود.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج مشخص شد که کرم گیاهی دکتر کامکار دارای اثرات ضد میکروبی مناسب می‌باشد و می‌تواند به عنوان یک عامل ضد میکروبی به تنهایی یا به همراه آنتی‌بیوتیک‌ها در عفونت‌های حاصل از انواع مختلف زخم معرفی گردد.

کلمات کلیدی: کرم گیاهی دکتر کامکار، اثرات ضد میکروبی، MIC، MBC

نرگس گلاب^{۱،۲}، محمد مهدی کامکار^۱، سهیلا مرادی بیده‌ندی^۲، ایده کامکار^۱، محمد نوری سپهر^۳، مهدی قره خانی^۴، فریبا قاسمیان^۱، پژواک خاکی^{۲*}

^۱ لابراتوارهای بین المللی و تحقیقاتی دکتر کامکار، تهران، ایران

^۲ بخش میکروب شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

^۳ گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

^۴ مرکز تحقیقات بهداشت، ایمنی و محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

نویسنده مسئول:

بخش میکروب شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۰۹۱۲۳۸۹۴۹۸۶
E-mail: p.khaki@rvsri.ac.ir

مقدمه

گیاهان دارویی میراث‌های بومی هستند که از اهمیت جهانی و فراگیر برخوردارند. آنها مخازن غنی از مواد مؤثره اولیه بسیاری از داروها هستند که عمدتاً متابولیت‌های ثانویه گیاه محسوب می‌شوند.^{۱،۲} از جمله ترکیباتی مانند مواد فنلی که دارای اثرات ضد میکروبی بر علیه بسیاری از میکروارگانیسم‌های بیماریزاست که با اختلال در ساختمان غشای سلولی و افزایش نفوذپذیری باعث از بین رفتن میکروارگانیسم‌ها مخصوصاً در عفونتها می‌شوند.^{۳،۴} هزاران سال است که بشر دریافته گیاهان منابع بسیار خوبی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله در زخم‌ها می‌باشند.^۵ در سراسر جهان سالانه هزاران نفر به انواع مختلف زخم دچار می‌شوند. زخم‌ها بویژه زخم‌های مزمن، تأثیر بسزایی بر روی بیماران دارند و به طور جدی باعث کاهش کیفیت زندگی آنها شده و نیز بدلیل طولانی شدن درمان، امکان عفونت با انواع میکروارگانیسمها وجود دارد.^{۶،۷} همچنین بیماران در هنگام بستری طولانی مدت در بیمارستان ممکن است به عفونتهای بیمارستانی مبتلا شوند.^۸ امروزه استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک‌ها که عامل اصلی درمان در عفونتها می‌باشند، باعث ایجاد افزایش مقاومت میکروبی شده است.^{۹،۱۰} متأسفانه گزارشات حاکی از آنست که اکثر آنها مقاوم به چند دارویی یا MDR (Multiple Drug Resistance) هستند که ماهیت طبیعی و اکتسابی این میکروارگانیسم‌ها در مقاومت به انواع آنتی بیوتیک‌های جدید و مرگ و میر ناشی از آن موضوعی است که در سالهای اخیر بعنوان یک مشکل در سراسر جهان محسوب شده و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی حائز اهمیت است.^{۱۱} استفاده از آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف که دارای اثرات جانبی و طولانی شدن درمان عفونت در زخم‌ها می‌شوند، همچنین آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از کارخانجات داروسازی از جمله عوامل پیشرفت تحقیقات در زمینه گیاهان دارویی برای درمان کمکی عفونتهای میکروبی بوده و مورد توجه محققین قرار گرفته است.^{۱۲}

باتوجه به موارد فوق و هزینه بالای درمان در بیماران و خوشبختانه چون ایران از نظر جغرافیایی تنوع گیاهی وسیعی دارد و دسترسی به آن راحت و ساخت کرم داخلی هم ارزان، موثر و هم از نظر اقتصادی، باعث اشتغال زایی و در جلوگیری از خروج ارز

اهمیت دارد، شرکت عطراگین با قدمتی بالغ بر ۸۰ سال در زمینه محصولات آرایشی و بهداشتی بر آن شد تا کرمی تماماً گیاهی طی سال‌ها تحقیق و بررسی تولید نماید. ترکیبات آن شامل بیش از ۲۰ روغن و عصاره تعدادی از گیاهانی مانند زردچوبه، چای سبز، کنجد، آلوئه ورا، مورد، آرنیکا، روغن بادام شیرین، عسل و غیره می‌باشد. براساس تحقیقات بالینی که در مراکز مختلف دانشگاهی و تحقیقاتی انجام گرفت، مشخص شد که استفاده از این کرم گیاهی باعث تسریع در روند التیام، شدت خون رسانی، میزان ایجاد بافت مزانشیمی و نیز باعث از بین رفتن التهاب زخم و کاهش چشم گیر وسعت زخم در زخم‌های مزمن مانند زخم فشاری، پای دیابتیک، سوختگی و نیز در زخم‌های پس از جراحی، لیزرتراپی، پرتودرمانی، شیمی درمانی و غیره شده، لذا از این کرم به عنوان ترمیم کننده در بهبود زخم‌های نامبرده استفاده می‌گردد و نتایج بسیار مطلوبی حاصل شده است.

هدف از اجرای این تحقیق بررسی اثرات ضد میکروبی کرم گیاهی دکتر کامکار بر روی سویه‌های مختلف میکروبی بیماریزا در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های میکروبی

تعداد ۱۱ سویه میکروبی مورد استفاده در این تحقیق از کلکسیون میکروبی بخش میکروب شناسی موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی کرج تهیه شد. این میکروارگانیسم‌ها شامل ۵ سویه استاندارد که شامل استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سوبتی لیس، اشرشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا و کاندیدا آلبیکنس و ۵ سویه بالینی جدا شده از زخمهای عفونی در بیماران بود (جدول ۱).

کشت سویه‌های میکروبی

باکتری‌ها روی محیط‌های جامد مک کانکی، بلاد آگار، TSA (تریپل سوی آگار) و محیط مایع TSB (تریپل سوی براث) حاوی ۱۰ درصد سرم اسب و قارچ کاندیدا آلبیکنس روی محیط سابروز دکستروز آگار (SDA) کشت داده شدند. پس از حصول اطمینان رشد و

کمک پنس استریل، دیسک هایی را که برای تعیین MIC در سطح پلیت قرار داده شده بود، برداشته و سپس توسط لوپ استریل از ناحیه عدم رشد ایجاد شده در زیر هر دیسک، نمونه برداری کرده و در سطح محیط کشت مولر هیتون آگار به صورت خطی کشت داده شد. پلیت های کشت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و پلیت حاوی قارچ در انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. کمترین رقتی از کرم که توانسته بود موجب مرگ باکتری شود، به عنوان MBC در نظر گرفته شد

مقایسه حساسیت باکتری های حساس به کرم نسبت به آنتی بیوتیک های منتخب

تعیین حساسیت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها از روش Kirby & Bauer براساس استاندارد CLSI انجام گردید. بدین ترتیب مانند قبل سوسپانسیون استاندارد میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند هر سویه تهیه، با سوآپ استریل آغشته به هر سویه جداگانه روی محیط کشت مولر هیتون آگار تلقیح شد. تعداد ۱۹ عدد دیسک آنتی بیوتیک (جدول ۲) با پنس استریل در فواصل مناسب روی محیط در کنار شعله قرار گرفت. قطر هاله های عدم رشد ایجاد شده در اطراف چاهک ها با کولیس بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد. نتایج با استفاده از جداول استاندارد CLSI 2018، برای هر یک از آنتی بیوتیک ها، به صورت حساس، مقاوم و یا نیمه حساس گزارش گردید.

نتایج

اثرات ضد میکروبی بروش چاهک گذاری

فعالیت ضد میکروبی کرم علیه میکروارگانیسم های مذکور در محیط آزمایشگاه به صورت کمی و کیفی توسط مشاهده قطر هاله عدم رشد تعیین گردید. کرم از ۱۱ میکروارگانیسم مورد آزمایش، به ۱۰ سویه دارای اثرات ضد میکروبی بود و فقط باکتری اشرشیا کلی نسبت به کرم مقاومت نشان داد. بیشترین تأثیر را نسبت به باسیلوس سوبتی لیس (۳۱ mm) و کمترین تأثیر را بر سودوموناس آئروژینوزا (۱۴ mm) دارا بود. (جدول ۳)

خلوص آنها آزمایشات تفریقی و بیوشیمیایی جهت تایید انجام گردید.

تعیین اثرات ضد میکروبی کرم گیاهی

اثرات ضد میکروبی کرم با روشهای چاهک گذاری، تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) مورد آزمایش قرار گرفت. ابتدا سوسپانسیون میکروبی با غلظت $10^8 \times 1/5$ CFU/ml معادل ۰/۵ مک فارلند در هر سویه تهیه و با سوآپ استریل آغشته به هر سویه جداگانه روی محیط کشت مولر هیتون آگار تلقیح شد.

در روش چاهک گذاری با ایجاد چاهک هایی بر روی محیط با فواصل مناسب در کنار شعله انجام شد. سپس مقدار مناسب از کرم مورد بررسی (رقیق شده با PBS استریل با غلظت ۱:۱) به چاهک ها افزوده گردید. پلیت ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸-۲۴ ساعت و پلیت SDA در انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت برای قارچ قرار داده شدند. قطر هاله عدم رشد بوسیله کولیس اندازه گیری شد. این آزمایش سه بار تکرار گردید.

در روش MIC بدلیل کدورت کرم و جلوگیری از تشخیص اشتباه میزان کدورت با رشد سویه ها، بجای استفاده از لوله، از روش دیسک گذاری روی محیط کشت جامد مولر هیتون آگار و بررسی هاله عدم رشد استفاده گردید.

بدین منظور ابتدا کرم مورد بررسی توسط PBS استریل در چندین لوله به ترتیب یعنی ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ و ۱۵/۶ میکروگرم، رقت های متوالی تهیه شد. سپس سوسپانسیون استاندارد میکروبی ۰/۵ مک فارلند از سویه هایی که کرم نسبت به آنها دارای اثرات ضد میکروبی بود، با سوآپ استریل آغشته به هر سویه جداگانه روی محیط کشت مولر هیتون آگار تلقیح شد. دیسکهای بلانک کاغذی ۶ میلیمتری با پنس استریل در فواصل مناسب در کنار شعله روی محیط قرار گرفت. از تمام رقت ها حجم معینی (۳۰ میکرو لیتر) توسط سمپلر بر روی دیسکها اضافه شد. پلیت ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸-۲۴ ساعت و پلیت حاوی قارچ در انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. اولین رقتی از کرم که دارای هاله عدم رشد بود، بعنوان MIC در هر سویه در نظر گرفته شد.

جهت تعیین کمترین غلظت کشندگی کرم یا MBC، ابتدا به

جدول ۱: میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در این تحقیق

Number		Organism	RTCC	ATCC
1	Positive gram	<i>Bacillus anthracis</i>	1036	–
2		<i>Bacillus cereus</i>	1046	-
3		<i>Bacillus subtilis</i>	1053	6633
4		<i>Staphylococcus aureus</i>	1885	25923
5		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1892	29887
6	Negative gram	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1911	-
7		Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	1889	-
8		<i>Acinetobacter baumannii</i>	1015	-
9		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1477	-
10		<i>Escherichia coli</i>	2325	25920
11	Fungi	<i>Candida albicans</i>	144	10231

RTCC: Razi type culture collection

ATCC: American type culture collection

جدول ۲: دیسک‌های آنتی بیوتیک مورد استفاده در این تحقیق

شماره	آنتی بیوتیک	شماره	آنتی بیوتیک
۱	آمیکاسین (AN)	۱۱	سفازولین (CZ)
۲	آمپی سیلین (AM)	۱۲	جنتامایسین (GM)
۳	آموکسی سیلین کلانولانیک (AMC)	۱۳	ایمی پنم (IPM)
۴	اریترومایسین (E)	۱۴	سفپیم (FEP)
۵	آموکسی سیلین (AMX)	۱۵	سفالکسین (CN)
۶	تتراسایکلین (TE)	۱۶	سفوتاکسیم (CTX)
۷	سفترایکسون (CRO)	۱۷	کانامایسین (K)
۸	سیپروفلوکساسین (CP)	۱۸	کلیندامایسین (CC)
۹	تیکارسین (TIC)	۱۹	نالییدیسیک اسید (NA)
۱۰	سفکسیم (c)		

حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC)

همان طور که در جدول ۳ دیده می‌شود، در این روش بیشترین تأثیر به باسیلوس سرئوس $MIC = 0.62 \text{ mg/ml}$ و کمترین تأثیر بر استرپتوکوکوس پایورنز و کاندیدا آلبیکنس $MIC = 100 \text{ mg/ml}$ مشاهده شد.

حداقل غلظت کشندگی رشد (MBC)

نتایج MBC نشان داد که بیشترین تأثیر کرم بر روی باسیلوس سرئوس $MBC = 3.12 \text{ mg/ml}$ و کمترین تأثیر در سودوموناس آئروژینوزا $MBC = 50 \text{ mg/ml}$ می‌باشد. همچنین بر طبق جدول شماره ۳ نسبت به استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، استرپتوکوکوس پایورنز و کاندیدا آلبیکنس فاقد اثر کشندگی بود.

مقایسه نتایج آنتی بیوگرام

بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های مورد بررسی نشان داد که بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک‌های آمیکاسین (AN)، آموکسی سیلین (AMX)، سفازولین (CZ)، سفترایکسون (CRO)، سفپیم (FEP)، سفالکسین (CN)، سفکسیم (CFM)، سفوتاکسیم (CTX)، کانامایسین (K) و کلیندامایسین (CC) وجود داشت. همچنین نتایج نشان داد که سویه‌های جدا شده از زخم‌های عفونی در بیماران دارای مقاومت چند دارویی (MDR) می‌باشند. بطوریکه حداقل به ۶ آنتی بیوتیک (در مورد استرپتوکوکوس پایورنز) و حداکثر به ۱۴ آنتی بیوتیک (در مورد سودوموناس آئروژینوزا) مقاوم بودند (جدول ۴).

جدول ۳: میانگین قطر هاله عدم رشد، میانگین حداقل غلظت بازدارندگی و میانگین حداقل غلظت کشندگی

میکروارگانیزم	*میانگین قطر هاله عدم رشد (mm)	**میانگین حداقل غلظت بازدارندگی MIC (mg/ml)	**میانگین حداقل غلظت کشندگی MBC (mg/ml)
باسیلوس آنتراسیس	۲۵	۱۲/۵	۲۵
باسیلوس سرئوس	۱۶	۰/۶۲	۳/۱۲
باسیلوس سوبیتی لیس	۳۱	۳/۱۲	۶/۲۵
استافیلوکوکوس ارئوس	۲۲	۳/۱۲	۶/۲۵
استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس	۲۰	۶/۲۵	۱۲/۵
استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی سیلین	۱۴	۲۵	۰
استرپتوکوکوس پایورنز	۱۲	۱۰۰	۰
اسیتو باکتر بومانی	۲۲	۱۲/۵	۲۵
سودوموناس آئروژنیوزا	۱۴	۲۵	۵۰
اشرشیا کلی	۰	۰	۰
کاندیدا آلبیکنس	۱۲	۱۰۰	۰

*مقدار فعالیت ضدباکتریایی کرم متناسب با بزرگی عدد مندرج در جدول است. **عدد کوچکتر نشاندهنده اثر ضدمیکروبی بهتر بر میکروارگانیزم است.

جدول ۴: تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سویه‌های مورد آزمایش به روش دیسک گذاری (قطر هاله برحسب میلی‌متر mm)

ردیف	آنتی بیوتیک	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
۱	آمیکاسین (AN)	حساس	۲۶.۴	۳۷	۰	۰
۲	آمپی سیلین (AM)	حساس	۲۷	۲۴.۱۸	۰	۰
۳	آموکسی سیلین کلانولانیک (AMC)	حساس	۲۷.۱۶	۳۲.۸	۲۰.۶	۱۸.۶
۴	اریترومایسین (E)	حساس	۱۸	۱۶.۷۵	۸.۸	۰
۵	آموکسی سیلین (AMX)	حساس	۳۱.۸	۲۹.۱۱	۰	۰
۶	تتراسایکلین (TE)	حساس	۳۷.۸	۴۲.۸	۲۳.۶	۰
۷	سفازولین (CZ)	حساس	۲۴.۱	۲۹	۰	۰
۸	سفتراکسون (CRO)	مقاوم	۱۳.۵	۲۴.۵	۱۰	۱۳.۸
۹	سیپروفلوکساسین (CP)	حساس	۴۱	۴۳	۱۷.۱۵	۱۹.۷۲
۱۰	تیکارسین (TIC)	حساس	۲۵.۹	۳۵.۱۱	۱۶.۲۵	۲۱.۳۵
۱۱	جتنامایسین (GM)	حساس	۳۰	۳۳.۷	۱۴.۲	۲۱
۱۲	ایمی پنم (IPM)	حساس	۳۴.۵	۳۵	۲۴.۵۷	۱۵.۹
۱۳	سفپیم (FEP)	مقاوم	۰	۸	۰	۰
۱۴	سفالکسین (CN)	حساس	۲۳.۶	۲۵	۱۰.۴	۰

۱۵	سفکسیم (CFM)	8	28.9	0	0	0
		مقاوم	حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم
۱۶	سفوناکسیم (CTX)	0	24.7	0	0	0
		مقاوم	حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم
۱۷	کانامایسین (K)	0	0	18.8	23.28	8.2
		مقاوم	مقاوم	حساس	حساس	مقاوم
۱۸	کلیندامایسین (CC)	0	9.8	0	0	0
		مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
۱۹	نالیدیکسیک اسید (NA)	33.8	34.3	19.2	28.5	0
		حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم

ردیف	آنتی بیوتیک	<i>Streptococcus pyogenes</i>	MRSA	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
۱	آمپیکاسین (AN)	13.54	12.75	11.4	17
		نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم
۲	آمپی سیلین (AM)	23	0	10.7	22
		حساس	مقاوم	مقاوم	حساس
۳	آموکسی سیلین کلانولانیک (AMC)	26.17	0	10	11.90
		حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم
۴	اریترومایسین (E)	25.82	0	18.5	16.8
		حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم
۵	آموکسی سیلین (AMX)	0	0	8.9	13.7
		مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
۶	تتراسایکلین (TE)	23.6	0	12.3	25.5
		حساس	مقاوم	مقاوم	حساس
۷	سفازولین (CZ)	0	21.67	14.86	18.53
		مقاوم	حساس	مقاوم	مقاوم
۸	سفترایکسون (CRO)	35	0	17.35	20.7
		حساس	مقاوم	حساس	مقاوم
۹	سیپروفلوکساسین (CP)	19.51	27.58	26.3	23.3
		نیمه حساس	حساس	حساس	حساس
۱۰	تیکارسین (TIC)	28.35	0	22.9	27.25
		حساس	مقاوم	حساس	حساس
۱۱	جنتامایسین (GM)	11.68	13	17.1	16.7
		نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم
۱۲	ایمی پنم (IPM)	23.18	23	23.75	21.9
		حساس	حساس	حساس	نیمه حساس
۱۳	سفپیم (FEP)	26.54	0	0	0
		حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم
۱۴	سفالکسین (CN)	28.16	0	9	11
		حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم
۱۵	سفکسیم (CFM)	24.26	0	12.9	14.2
		حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم
۱۶	سفوناکسیم (CTX)	0	0	12.56	19.56
		مقاوم	مقاوم	مقاوم	نیمه حساس
۱۷	کانامایسین (K)	0	0	18.6	13.10
		مقاوم	مقاوم	نیمه حساس	مقاوم
۱۸	کلیندامایسین (CC)	0	0	0	0
		مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
۱۹	نالیدیکسیک اسید (NA)	0	12.77	11.8	12.5
		مقاوم	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم

بحث

زخم‌ها و نیز باعث ایجاد عفونت های ناشی از بستری شدن در بیمارستان می باشند.^{۲۰، ۸}

در مطالعه حاضر از میکروارگانیسم های شایع در عفونت زخمها و اکثراً مقاوم به چند دارویی که شامل استافیلوکوکوس ارئوس، استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی سیلین، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، استرپتوکوکوس پایوژنز، باسیلوس سوبتی لیس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس آنتراسیس، اشرشیا کلی، سودوموناس آئروژینزا، اسیتوباکتر بومانی و قارچ کاندیدا آلیکنس که جزء عفونت های شایع بیمارستانی بوده و سیر مقاومت آن ها به آنتی بیوتیک ها رو به افزایش است، استفاده گردید. با توجه به نتایج بدست آمده مشخص شد که کرم گیاهی دارای اثرات ضد میکروبی نسبت به ۱۰ مورد از میکروارگانیسم های نامبرده بود و تنها نسبت به اشرشیاکلی اثر ضد میکروبی مشاهده نشد. همچنین براساس نتایج MIC و MBC در محدوده رقت های ۵۰mg/ml - ۰/۶۲ کرم باعث مهار رشد در میکروارگانیسم های مورد نظر و در محدوده رقت های ۱۰۰mg/ml - ۳/۱۲ موجب از بین رفتن آنها شد. (جدول شماره ۳) در این بررسی تأثیر کرم بر میکروارگانیسم های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی (اسیتوباکتر بومانی و سودوموناس آئروژینزا) و قارچ (کاندیدا آلیکنس) بود که می تواند به علت وجود دیواره سلولی ضخیم تر در باکتری های گرم منفی و کیتین در قارچها باشد که این نتایج با یافته های رزمجو و همکاران که در سال ۱۳۹۴ با طی دو مطالعه اثر ضد میکروبی عصاره پوست پرتقال بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و کاندیدا آلیکنس^{۲۱، ۲۲} و همچنین Kirbaslari و همکاران با تعیین اثرات ضد میکروبی عصاره چندین گیاه پرداختند، همسو می باشد.^{۲۳} زردچوبه که یکی از مواد متشکله کرم مورد بررسی است و پژوهشگران معتقدند، این گیاه بدلیل دارا بودن کورکومین خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری های گرم مثبت دارد و می تواند از عفونت زخم جلوگیری کند.^{۲۴، ۵} نتایج تحقیقات سین یانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۶ حاکی از آن بود که فعالیت ضد باکتریایی اسانس زردچوبه نسبت به سویه های استاندارد و بالینی استافیلوکوکوس ارئوس و اپیدرمایدیس موثر و mg/ml MIC=۲ بود.^{۲۵} در حالیکه نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کرم گیاهی مورد بررسی دارای اثرات ضد میکروبی نسبت به هر دو

گیاهان دارویی یا داروهای گیاهی بدلیل سهل الوصول بودن و دارا بودن اثرات ضد میکروبی می توانند به صورت آلترناتیو به جای آنتی بیوتیک ها در درمان میکروب ها یا میکروب های مقاوم به چند دارویی یا MDR در درمان عفونتها مورد استفاده قرار گیرند.^{۱۰، ۱۲، ۱۳} Dabur و همکاران در سال ۲۰۰۷ در هند به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی ۲۲ گیاه بر روی ۸ باکتری و ۴ قارچ بیماریزا مطالعه ای انجام دادند که نتایج مویید دارا بودن اثرات ضد میکروبی عصاره گیاهان بطور بالقوه می باشند.^{۱۴} از دیگر ویژگی های مهم مواد موثره گیاهی چند هدف بودن آنها در درمان های مختلف خصوصاً در زخمها می باشد. مثلاً یک داروی گیاهی علاوه بر اثرات ضد میکروبی دارای اثرات ترمیم کنندگی بافت، کلاژن سازی و غیره می باشد. از جمله Ho و همکاران در سال ۲۰۱۶ در کشور تایوان به بررسی اثر درمانی یک کرم گیاهی که متشکل از ۹ ترکیب طبیعی مختلف از گیاهان چینی سنتی بود، پرداختند که در درمان زخم های عمیق موفقیت آمیز بود.^{۱۵} مجنونی و همکاران در ایران با استفاده از روشهای MIC و انتشار دیسک اثرات ضد میکروبی عصاره آبی الکلی گیاه شنبلیله را بر روی سویه های مختلف میکروبی انجام دادند که نتایج نشانگر اثر ضد میکروبی آن بر باکتری های گرم مثبت بود.^{۱۶} بنابراین عصاره های گیاهی می تواند در فرآورده های ضد میکروبی در صنایع داروسازی و غذایی به کار گرفته شود. در سالهای اخیر یکی از مهم ترین مشکلات جوامع بشری عوامل عفونت های بیمارستانی هستند که منجر به بروز عفونت های مختلف به ویژه پس از جراحی می گردند.^۸ از جمله سویه های استافیلوکوکوس ارئوس که هم از طریق تولید توکسین و هم از طریق تکثیر در بافت و ایجاد التهاب موجب بیماری و حتی مرگ و میر می شوند.^{۱۶، ۱۷} همچنین یکی دیگر از معضلات زمان حاضر در روند درمان بیماری های عفونی و از جمله در سوختگی ها بروز اسیتوباکترهای مقاوم به درمان و سودوموناس آئروژینزا که علاوه بر نقش مهمی که در عفونت های بیمارستانی دارند، مرگ و میرهای بسیاری را نیز بدنبال دارند.^{۱۸، ۱۹} از دیگر باکتری های مقاوم به درمان استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، استرپتوکوکوس پایوژنز، اشرشیاکلی و همچنین قارچ کاندیدا آلیکنس است که جزء میکروارگانیسم های شایع در عفونت

باکتری بوده ولی حداقل غلظت بازدارندگی رشد برای باکتری استافیلوکوکوس ارئوس ۳/۱۲ mg/ml و برای اپیدرمایدیس ۶/۲۵ mg/ml بودند.

در مطالعه دیگر رضوی و همکاران با هدف مروری بر خواص آنتی باکتریال برخی از گیاهان دارویی ایرانی اذعان داشتند که آنها دارای خواص آنتی باکتریال بر ضد انواع باکتری‌های پاتوژن می‌باشند که این نتایج با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت دارد.^{۲۶}

پژوهشهایی که بر روی تأثیر عصاره گیاه مورد بر اشرشیا کلی انجام شده که در فرمولاسیون کرم مورد بررسی نیز وجود دارد، بیشتر گزارشها از عدم تأثیر آن بر این سویه باکتری حکایت دارد.^{۲۸} که با نتایج حاضر تطابق دارد.^{۲۹}

تحقیقات متعددی که در رابطه با دارا بودن اثرات ضدباکتریائی عصاره چای سبز نسبت به باکتری‌های گرم مثبت مانند استرپتوکوکوس پایونز و گرم منفی مانند اشرشیا کلی صورت گرفته است^{۳۰،۳۱} با وجود عصاره چای سبز در فرمولاسیون کرم با یافته‌های حاضر مغایرت داشت که می‌توان با تغییر در میزان آن به این نتیجه دست یافت.

براساس نتایجی که از الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در پژوهش اخیر بدست آمد (جدول شماره ۴)، جالب توجه این بود که اکثر ۱۰ میکروارگانیزمی که کرم دارای اثر ضد میکروبی نسبت به آنها بود به بیشتر آنتی بیوتیک‌های مورد بررسی مقاوم بودند و این نقطه عطفی است که می‌توان گفت استفاده از این کرم در درمان عفونت انواع زخم‌ها باعث از بین بردن عوامل میکروبی خواهد شد و نیاز به مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها را کاهش داده و یا از بین می‌برد.

یافته‌ها نشان داد که این کرم علاوه بر خواص ترمیم کنندگی در

زخمها، می‌تواند بعنوان یک ماده ضد میکروبی موثر به تنهایی یا به همراه آنتی‌بیوتیک‌های دیگر در عفونت‌های حاصل از زخم نیز استفاده شود.

با توجه به ارزشمند بودن این اثر، پیشنهاد می‌شود، با بررسی های بیشتر به صورت آزمایش های فارمکولوژی و بالینی در صورت نتایج بخش بودن با ارائه به بخش صنعت، تولید اشکال مختلف دارویی از این کرم در دستور کار قرار گیرد.

بطور کلی می‌توان گفت بخاطر خواص پر ارزش موجود در عصاره و روغن‌های گیاهی موجود در کرم به کمک روش‌های نوین می‌توان به شکل فراگیرتر و کاربردی تر استفاده شود.

همچنین بمنظور افزایش اثرات ضد میکروبی با تغییر در فرمولاسیون کرم و بررسی اثرات ضد میکروبی یک عصاره گیاهی مشخص از نقاط مختلف جغرافیایی کشور انجام گیرد، می‌توان با تحقیق بیشتر از آنها به فرمولاسیون اضافه گردد.

تشکر و سپاسگزاری

این مطالعه در قالب بخشی از یک پروژه تحقیقاتی مشترک مابین مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی کرج و شرکتهای عطراگین و لابراتوارهای دکتر کامکار با کد مصوب: ۹۷۱۰۶۵-۱۸۵۲-۱۸-۳ انجام شده است. بدین وسیله از همه عزیزانی که در به نتیجه رساندن این کار تحقیقاتی نقش داشتند، بویژه پرسنل عزیز بخش میکروب شناسی موسسه رازی و همچنین کادر محترم فرمولاسیون کرم در شرکت عطراگین از جمله سرکار خانم ریحانه جوادزاده کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایم.

References

1. Zargari A. Iranian Medicinal plants. Tehran University Press: Tehran. 1997; 485-488. [In Persian]
2. Ushimaru, P, I, Tomaz, M, et al, Antibacterial Activity of Medicinal Plant Extracts, Brazilian J Microbiol. 2007; 38: 717-719.
3. Vashist H, Jindal A. Antimicrobial activities of medicinal plants – Review. Int J Res Pharma Biomed Sci. 2012; 3(1): 222-30.
4. Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J, editors. Herbal medicine. 1st ed. USA: American Botanical Council; 2000.
5. Nouf D, Nudrat F, Naira NA, Punica granatum Rind, a Traditional Herbal Medicine: Effect on wound healing. Int J Pharma Res Allied Sci. 2017; 6(1):53-58
6. Ho, T, J, Jiang, S, J, Lin, G, H, et al. The In Vitro and In Vivo Wound Healing Properties of the Chinese Herbal Medicine (Jinchuang Ointment), Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Hindawi 2016.

7. Gordana R, Sunčica I. Pressure ulcers and their impact on the quality of life. *Acta Medica Medianae* 2014; 53(4):75-80.
8. Weinstein R. Controlling antimicrobial resistance in hospitals: Infection control and use of antibiotics. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7(2):188-92.
9. Leski TA, Vora GJ, Barrows BR, Pimentel G, House BL, Nicklasson M, et al. Molecular Characterization of Multidrug Resistant Hospital Isolates Using the Antimicrobial Resistance Determinant Microarray. *PLoS ONE* 2013; 8(7): e69507
10. Wang M, Wei H, Zhao Y, Shang L, Di L, et al. Analysis of multidrug-resistant bacteria in 3223 patients with hospital-acquired infections (HAI) from a tertiary general hospital in China. *Bosn J Basic Med Sci.* 2019; 19(1): 86-93.
11. Ali Khan U, Hazir R, Zeeshan N, Muhammad Q, Jafar Khan, et al. Antibacterial activity of some medicinal plants against selected human pathogenic bacteria. *Eur J Microbiol Immunol.* 2013; 3(4): 272-274.
12. Vashist H, Jindal A. Antimicrobial activities of medicinal plants – Review. *Int J Res Pharma Biomed Sci.* 2012; 3(1): 222-230.
13. Lewis K, Ausubel FM. Prospects of plant derived antibacterials. *Nat Biotechnol.* 2006; 24(12):1504-1507.
14. Dabur, R, Gupta, A, et al. Antimicrobial Activity of Some Indian Medicinal Plants, *Afr. J. Trad. Cam.* 2007; 4(3): 313 - 318.
15. Majnooni MB, Abiri R, Malek Khataie P, Adibi H. Study of Antimicrobial Effects of *Trigonella Foenum hydro-alcoholic Extract* on Different Bacterial Strains. *Med Lab J.* 2009; 3(1): 31.[In Persian]
16. Woo KY, Sears K, Almost J, Wilson R, Whitehead M, et al. Exploration of pressure ulcer and related skin problems across the spectrum of health care settings in Ontario using administrative data. *Int Wound J.* 2015; 20.
17. Akhavan Sepahi A, Khanafari A, Sojoudi Sh, Yarigar Ravesh M, Jamshidi A,H, et al. The Effects Of Garlic And Cardamom Extracts On Morphology And Physiology Properties *Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) And Pseudomonas Aeruginosa*. *J Medicin Plants* 2008; 7(25): 29 - 38.
18. Farshadzadeh Z, Hashemi, F, Rahimi S, Pourakbari B, Esmaeili D, et al. Wide distribution of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in burns patients in Iran. *Front Microbiol.* 2015; 6: 1146.
19. Manuel R, Gonzalez, Fleuchot B, Lauciello L, Jafari P, Applegate LA, et al. Effect of Human Burn Wound Exudate on *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *American Soc. Microbiol.* 2016; 1 (2) e00111-15.
20. Mulvey M R, Simor AE. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? *CMAJ.* 2009; 180(4): 408-415.
21. Razmjoo M, Khaki P, Faghih Nasiri M, Rezaei K. Possibility Study of Multilayer Encapsulation by External Gelation Procedure on the Survival of Probiotic Bacteria Undergoing Orange Juice Pasteurization. *Iranian J Nutrit Sci. Food Techno.* 2016; 11(1). [In Persian]
22. Razmjoo M, Khaki P, Fadaee Noughani V. Antimicrobial effect of aqueous extract of orange peel and its effect on the shelf-life of flavored milk. *J Gorgan Uni Med Sci.* 2016; 18(3): 97-102. [In Persian]
23. Kirbaslari FG, Tavman A, Dulger B, Turker G. Antimicrobial Activity of Turkish Citrus peel. *Pok J Bot.* 2009; 41:3207-12.
24. Kim, K, Hyeon-Hee Yu, Jung-Dan Cha, Se-Jeong Seo. Antibacterial activity of *Curcuma longa L.* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytotherapy Res.* 2005; 19(7) 557-654.
25. Teow SY, Liew K, Ali SA, Khoo A S, Peh SC. Antibacterial Action of Curcumin against *Staphylococcus aureus*: A Brief Review. *J Trop Med.* 2016; 28:53045.
26. Razavi N, Molavi Choobini Z, Salehian-Dehkordi M, Saleh Riyahi S, Salehian-Dehkordi M, et al. Overview of the antibacterial properties of essential oils and extracts of medicinal plants in Iran. *J Shahrekord Univ Med Sci.* 2016; 17(1): 41-52.
27. Nabeuni M, Azarnia M, Mousavi R, Ramezani T. The effect of *Myrtus Communis* leave extract cream on wound healing process in Wistar rats. *cmja.* 2014; 4(3): 854-864.
28. Aboaba O, Smith S, Olude F. Antibacterial Effect of Edible Plant Extract on *Escherichia coli* 0157:H7. *Pakistan Journal of Nutrition* 2006;5 (4): 325-327.
29. Hussein HJ, Nebras M, Al-Khafaji S, Habeeb A, et al. Antimicrobial Effect of the Crude Phenolic, Alkaloid and Terpenoid Compounds Extracts of *Myrtus Communis L.* against Human Gram-Negative Pathogenic. Bacteria. *J Glob pharm Technol.* 2016; 8(9):130-133
30. Konishiy S, Kudoy H, Amana F, Okubot A, Iwaki M, et al. Epigallocatechin gallate and gallic acid in green tea catechins inhibit extracellular release of verotoxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1472:42-50.

Narges Golab^{1,2}, Mohammad Mehdi Kamkar¹, Sohiela Moradi Bidhendi², Ideh Kamkar¹, Mohammad Noorisepehr^{3,4}, Mehdi Gharakhani², Fariba Ghaesmian¹, Pejvak Khaki^{2*}

¹ International Laboratories of Dr Kamkar, Tehran, Iran

² Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

³ Department of Environmental Health Engineering, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

⁴ Research Center for Health, Safety and Environment, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

Study on the Antimicrobial Effects of Dr. Kamkar's Herbal Cream on Different Pathogenic Microbial Strains

Received: 18 May 2020 ; Accepted: 26 Jul 2020

Abstract

Backgrounds: Due to their antibacterial effects, herbal remedies have an important role in the treatment of infections; particularly in infected wounds. Increased bacterial resistance to antibiotics combined with increased side effects related to their administration has led many researchers to investigate alternative herbal treatments in recent years. In line with this trend, the objective of this study was to assess the antimicrobial effects of Dr Kamkar's cream on different microbial strains *in vitro*.

Methods: The susceptibility of isolates to the cream was evaluated using well diffusion, the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) methods. 11 microorganisms were analyzed which included 5 strains routinely used to assess antibacterial effects and 6 clinical isolates were obtained from patients' wounds. Based on CLSI (2018) standards, the Kirby & Bauer method was utilized to investigate the sensitivity of the strains to commonly used antibiotics.

Results: The herbal cream was effective against 10 strains, while only 1 strain demonstrated resistance. *Bacillus subtilis* was the most susceptible bacteria to the cream with a zone of Inhibition of 31mm, followed by *Bacillus anthracis* (25mm), *Staphylococcus aureus* (22mm), *Acinetobacter baumannii* (22mm), *Staphylococcus epidermidis* (20mm), *Bacillus cereus* (16mm), *Pseudomonas aeruginosa* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (14mm), *Streptococcus pyogenes* and *Candida albicans* (20mm) and resistant to *Escherichia coli*.

MIC findings indicated that the herbal cream had maximal effect against *Bacillus cereus*, and minimal efficiency against *Streptococcus pyogenes* and *Candida albicans*, while MBC results showed maximal effect against *Bacillus cereus* and minimal effect against *Pseudomonas aeruginosa*.

Results of antibiograms revealed resistance to several antibiotics.

Conclusion: According to the results, Dr Kamkar's herbal cream has suitable antimicrobial activity against certain pathogenic microorganisms and can be used alone or in combination with Antibiotics in the treatment of infected wounds.

Keywords: Dr Kamkar's herbal cream, Antimicrobial effects, MIC, MBC

*Corresponding Author:

Department of Microbiology,
Razi Vaccine and Serum
Research Institute,
Agricultural Research,
Education and Extension
Organization (AREEO), Karaj,
Iran

Tel: 0263450284

E-mail: P.khaki@rvsri.ac.ir