



بررسی اثر ضدباکتریایی نانو ذره مشتق جدید اسپایرواکس ایندول روی ایزوله‌های اشریشیا کلی مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف از بیماران مبتلا به عفونت ادراری بیمارستان‌های شهر کرج

پرستو سعادت: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
اکرم سادات طباطبایی بفرویی: استادیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (* نویسنده مسئول)
a.tabatabaee@iauet.ac.ir

لیلا جیل عاملی: استادیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
سمیه مکارم: استادیار شیمی تجزیه، گروه شیمی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

نانوذرات اسپایرواکس ایندول،
اشریشیا کلی،
بتالاکتامازهای وسیع الطیف،
عفونت دستگاه ادراری

زمینه و هدف: به دلیل افزایش عفونت دستگاه ادراری ناشی از سویه‌های اشریشیا کلی مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) و مقاومت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج، توسعه عوامل ضد میکروبی موثر جدید به ویژه ترکیبات بیولوژیک مبتنی بر نانوذرات نیاز ضروری می‌باشد. هدف این مطالعه، بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذره یک مشتق جدید اسپایرواکس ایندول علیه ایزوله‌های اشریشیا کلی مولد ESBLs از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری قرار گرفت.

روش کار: این مطالعه مشاهداتی - توصیفی روی ۶۰ ایزوله اشریشیا کلی بدست آمده از بیمارستان‌های شهر کرج، انجام شد. ایزوله‌ها با آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی شناسایی شدند. حساسیت ضد میکروبی ایزوله‌ها نسبت به سفپیم، سفنازیدیم، سفتریاکسون و سفوتاکسیم توسط روش انتشار دیسک سنجیده شد. مولدین بتالاکتامازهای وسیع الطیف توسط آزمون دیسک ترکیبی شناسایی شدند. نانوذرات مشتق جدید اسپایرواکس ایندول با روش الکتروستتز آماده شدند و توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره بررسی شدند. روش میکروداپلوشن برای جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) نانوذرات به کار گرفته شد.

یافته‌ها: مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۶۰ ایزوله عبارتند از: سفپیم ۲۳/۳۳٪، سفنازیدیم ۱۶/۶۶٪، سفتریاکسون ۳۰٪ و سفوتاکسیم ۳۱/۶۶٪. بر اساس آزمون تایید فنوتیپی، ۱۴ ایزوله به عنوان اشریشیا کلی مولد ESBLs شناسایی شدند. مقدار MIC نانوذرات اسپایرواکس ایندول مورد مطالعه ۵۰ µg/ml بدست آمد.

نتیجه‌گیری: با انجام مطالعات بیشتر، می‌توان نانوذره اسپایرواکس ایندول مورد مطالعه را به عنوان یک ترکیب ضد باکتریایی جدید معرفی کرد.

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۶/۰۹

تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۱۲

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

شیوه استناد به این مقاله:

Saadati P, Tabatabaee Bafroee AS, Jabalameli L, Makarem S. Evaluating the antibacterial effect of a new spirooxindole derivative nanoparticle on Extended Spectrum β -Lactamases (ESBLs) producing *Escherichia coli* from patients with urinary tract infections at hospitals of Karaj, Iran. Razi J Med Sci. 2020;26(12):56-66.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با 3.0 CC BY-NC-SA صورت گرفته است.

Original Article

Evaluating the antibacterial effect of a new spirooxindole derivative nanoparticle on Extended Spectrum β -Lactamases (ESBLs) producing *Escherichia coli* from patients with urinary tract infections at hospitals of Karaj, Iran

Parastoo Saadati, MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Akram Sadat Tabatabaee Bafroee, Assistant Professor of Microbiology, Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (* Corresponding author) a.tabatabaee@iauet.ac.ir

Leila Jabalameli, Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Somayeh Makarem, Assistant Professor of Analytical chemistry, Department of chemistry, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Abstract

Background: Due to the increase in urinary tract infection (UTI) caused by Extended-Spectrum β -lactamases (ESBLs) producing *Escherichia coli* strains and their resistance to conventional antibiotics, the development of new effective antimicrobial agents particularly nanoparticle based biological compounds is urgently required. The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect of a new derivative of spirooxindole nanoparticles against ESBLs producing *E. coli* isolates obtained from patients with UTI.

Methods: This descriptive-observational study was performed on 60 *E. coli* isolates from Karaj city hospitals. Isolates were identified by standard biochemical tests. Antimicrobial susceptibility of isolates against Cefepime, Cefotaxime, Ceftazidime, Ceftriaxone, was determined using the Disk Diffusion Method. The new derivative of spirooxindole nanoparticles was prepared by electrosynthesis and examined with a scanning electron microscopy (SEM). ESBLs producing isolates were detected by the Combined Disk test. The broth microdilution method was performed to determine the Minimum inhibitory concentration (MIC) of nanoparticles

Results: Antibiotic resistance of 60 *Escherichia coli* isolates was as follows: Cefepime 23.33%, Ceftazidime 16.66%, Ceftriaxone 30% and Cefotaxime 31.66%. 14 ESBLs producing *Escherichia coli* isolates were identified by a phenotypic confirmatory test. The MIC value of the understudied spirooxindole nanoparticles was obtained to be 50 μ g/ml.

Conclusion: Undertaking further studies, the understudied spirooxindole nanoparticle can be introduced as a new antibacterial compound.

Conflicts of interest: None

Funding: Islamic Azad University, Karaj Branch

Keywords

Spirooxindole nanoparticles, *Escherichia coli*, ESBLs, Urinary Tract Infection

Received: 31/08/2019

Accepted: 01/02/2020

Cite this article as:

Saadati P, Tabatabaee Bafroee AS, Jabalameli L, Makarem S. Evaluating the antibacterial effect of a new spirooxindole derivative nanoparticle on Extended Spectrum β -Lactamases (ESBLs) producing *Escherichia coli* from patients with urinary tract infections at hospitals of Karaj, Iran. Razi J Med Sci. 2020;26(12):56-66.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.



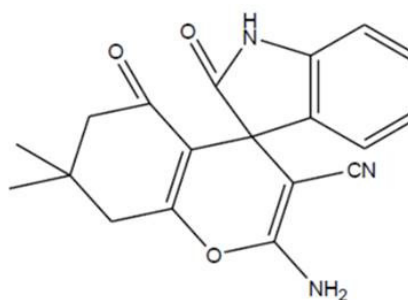
ویژگی‌های سازگاری قابل توجه و ساختارهای سه بعدی منحصر به فرد و وفورشان در محصولات طبیعی متعدد و مولکول‌های فعال بیولوژیکی، مورد توجه خاصی قرار گرفته‌اند. مشخصه ساختاری کلیدی این ترکیبات، حلقه اسپایرو متصل به موقعیت C_3 هسته اکس ایندول با اشکال هتروسیکلیک متنوع می‌باشد. از آنجا که این اسپایرواکس ایندولها همزمان دارای اکس ایندول و اشکال هتروسیکلیک می‌باشند، به نظر می‌رسد کاندیداهای نویدبخش برای کشف دارو باشند (۴،۳). مطالعات نشان داده‌اند، ترکیبات حاوی هسته اسپایرواکس ایندول دارای خواص بیولوژیکی متنوعی نظیر ضد سرطان (۵)، ضد میکروبی (۶)، ضد ویروس (۷) و غیره می‌باشند. نانو ذرات با خواص ضد میکروبی طیف وسیعی از ذرات را شامل می‌شوند که می‌توان فلزات، اکسید فلزات، سوبستراهای ضد میکروبی طبیعی و نانو مواد بر پایه کربن را نام برد. نانو ذرات به دلیل اندازه کمی که دارند سطح تماس بیش‌تری با فضای بیرون داشته و تأثیر بیشتری بر غشاء سلول‌ها می‌گذارند. افزایش سطح، واکنش‌پذیری نانو مواد را به شدت افزایش می‌دهد. این ذرات در زمینه کنترل بیماری‌های عفونی مورد استفاده قرار می‌گیرند و پاتوژن‌های میکروبی قادر به توسعه مقاومت در مقابل این ذرات نمی‌باشند (۸، ۹). در دهه‌های اخیر، تعداد زیادی از اسپایرواکس ایندول بر پایه واسطه‌های ایلید در شرایط آزمایشگاهی سنتز شدند و از نظر فعالیت ضد میکروبی علیه انواع مختلفی از باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفتند که منجر به کشف ترکیباتی با قدرت بالای ضد میکروبی شد (۱۰، ۱۱، ۱۲). ولی تاکنون این دسته از ترکیبات به فرم نانو ذره مورد بررسی قرار نگرفته است؛ بنابراین در این تحقیق، مشتق جدیدی از اسپایرواکس ایندول‌ها (شکل ۱) به صورت نانو ذره سنتز شد و اثرات ضدباکتریایی آن روی ایزوله‌های *شریشیا کلی* مولد ESBLs جدا شده از نمونه‌های ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری مورد بررسی قرار گرفت.

بیماران مراجعه‌کننده به بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها در معرض کسب عفونت‌های بیمارستانی و غیر بیمارستانی خصوصاً با باکتری‌های مقاوم به چند دارو می‌باشند. یکی از مهم‌ترین عوامل دخیل در عفونت‌های بیمارستانی، عفونت با باسیل‌های گرم منفی، از جمله باکتری *شریشیا کولای* است که عامل بیش از ۸۰ درصد عفونت‌های ادراری و یکی از عوامل اصلی ایجاد عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. از آنجایی که تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها برای کنترل و درمان بیماری‌های عفونی در بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها از مهم‌ترین اقدامات محسوب می‌شود، مقاومت باکتریایی نسبت به این داروها فواید بالینی این داروها را به خطر می‌اندازد. استراتژی‌های مختلفی توسط باکتری‌ها به کار گرفته می‌شود تا از اثرات زیان‌بار آنتی‌بیوتیک‌ها مصون بمانند. یکی از مهم‌ترین این مکانیسم‌ها تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف (β -ESBLs Extended Spectrum Lactanases) می‌باشد، آنزیم‌هایی که علاوه بر ایجاد مقاومت به پنی‌سیلین‌ها واسطه ایجاد مقاومت به طیف وسیعی از سفالوسپورین‌ها (نسل سوم) از جمله سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون و همچنین منو باکتام‌ها مانند آرترونام محسوب می‌شوند. میزان تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف در انتروباکتریاسه‌ها در سراسر جهان متفاوت می‌باشد. مطالعات نشان‌دهنده بیشترین میزان تولید ESBLs به ترتیب توسط *کلبسیلا نمونیه* و *شریشیا کلی* می‌باشد (۲۰۱).

از آنجایی که، مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به سطح بحرانی رسیده و متأسفانه هیچ تضمینی وجود ندارد که با توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید، بتوان به موقع بر گسترش پیوسته و سریع مقاومت غلبه کرد؛ بنابراین، درمان بیماری‌های عفونی نیاز به راه‌حل‌های بلند مدت دارد. اخیراً کشف ساختارهای جدید، به عنوان استراتژی کارآمد برای دستیابی به مولکول‌های زیستی اثربخش که بتوانند برخی عوامل بیولوژیکی را مورد هدف قرار دهند، به رسمیت شناخته شده است. ترکیبات اسپایرو به دلیل خواص بیولوژیکی برجسته،

جدول ۱- قطر هاله های مینا برای تعیین میزان حساسیت آنتی بیوتیکی

سویه های انتروباکتریاسه	آنتی بیوتیک	حساس (میلیمتر)	میان (میلیمتر)	مقاوم (میلیمتر)
سفپیم	> ۱۸	۱۷-۱۵	< ۱۴	
سفتازیدیم	> ۱۸	۱۷-۱۵	< ۱۴	
سفتریاکسون	> ۲۱	۲۰-۱۴	< ۱۴	
سفتوتاکسیم	> ۲۳	۲۲-۱۵	< ۱۴	



شکل ۱- ۲- آمینو-۷-دی متیل-۵-دی اکسو-۵-هکسوفو-۸-تتراهیدرو اسپایرو {۳-۴-ایندولین}-۳-کربونیتیل

روش کار

مواد: تمامی محیط های کشت و مواد شیمیایی استفاده شده در این تحقیق از شرکت مرک (کشور المان) تهیه گردید. دیسک های آنتی بیوتیک از شرکت پادتن طب (ایران) تهیه شدند.

جمع آوری نمونه، جداسازی و شناسایی ایزوله های اشریشیا کلی: این مطالعه توصیفی-مقطعی بر روی بیماران مشکوک به عفونت ادراری مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی و بیمارستان کسری شهر کرج با رعایت اصول اخلاقی (کد مصوبه کمیته اخلاق IR.IAU.K.REC.1396.031) در فاصله زمانی اسفند ۹۵ تا آخر اردیبهشت ۹۶ صورت گرفت. جهت جداسازی اشریشیا کلی، نمونه های ادرار بر روی محیط کشت مک کانکی اگر و ائوزین متیلن بلو کشت داده شدند و ایزوله ها با استفاده از تست های بیوشیمیایی متداول از جمله آزمایش احیاء نیترات، متیل رد- و ژپروسکوور (MR-VP)، بررسی H₂S-ایندول- حرکت (SIM) و سیمون سیترات (CS)، اوره و تخمیر گلوکز در محیط تریپل شوگر ایرن اگر (TSI) مورد بررسی قرار گرفتند (۱۳).

غربالگری ایزوله های مولد ESBLs به روش فنوتیپی: به منظور غربالگری اولیه ایزوله های مولد ESBLs از روش انتشار دیسک در اگر (Disk diffusion method) Kirby bauer- مطابق با دستورالعمل موسسه استاندارد CLSI استفاده شد (۲). بدین صورت که مایع تلقیح استاندارد شده (کدورتی معادل ۰/۵ مکفارلند) ایزوله های مورد مطالعه در محیط کشت مولر هینتون اگر تلقیح شدند. سپس دیسک های آنتی بیوتیک در فواصل مشخص روی محیط کشت قرار داده شدند و

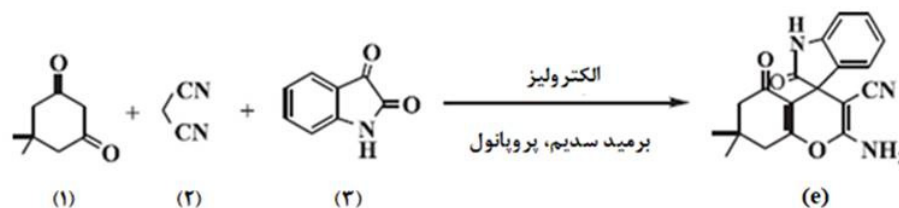
پلیتها به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری گردیدند. پس از گذشت زمان گرماگذاری، قطر هاله عدم رشد به وسیله خط کش اندازه گیری و تفسیر آن با توجه به جدول CLSI برای اشریشیا کلی صورت گرفت (جدول ۱). سویه استاندارد E. coli ATCC ۲۵۹۲۲ نیز به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. آنتی بیوتیک های مورد استفاده شامل سفپیم (۳۰ μg, CFP)، سفتازیدیم (۳۰ μg, CAZ)، سفتریاکسون (۳۰ μg, CRO) و سفتوتاکسیم (۳۰ μg, CTX) بودند.

تایید فنوتیپی ایزوله های مولد ESBLs: تولید ESBLs با استفاده از آزمایشون دیسک ترکیبی (Combined Disk test) تعیین گردید (۲). در این روش که مشابه از مون انتشار دیسک در اگر صورت گرفت، از آنتی بیوتیک های سفتازیدیم (۳۰ μg)، سفتازیدیم - اسید کلولانیک (۱۰/۳۰ μg)، سفتوتاکسیم (۳۰ μg)، سفتوتاکسیم - اسید کلولانیک (۱۰/۳۰ μg) و سفتریاکسون، سفتریاکسون - اسید کلولانیک استفاده شد. دیسک های آنتی بیوتیک به فاصله حداقل ۲۴ میلی متر از یکدیگر بر روی محیط قرار داده شدند. بعد از گرماگذاری به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، هاله عدم رشد اطراف دیسک حاوی اسید کلولانیک به عنوان مهار کننده آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف نسبت به بدون اسید کلولانیک سنجیده شد. به طوری که اگر هاله عدم رشد اطراف دیسک های حاوی اسید کلولانیک بزرگتر یا مساوی ۵ میلی متر نسبت به بدون اسید کلولانیک باشد، ایزوله مورد نظر را میتوان بر طبق استاندارد CLSI به عنوان مولد ESBLs در نظر گرفت. از طرفی به پیشنهاد این موسسه، ایزوله هایی که در تست فنوتیپی تاییدی اثر بتالاکتاماز در آنها به

غلظت‌های ۳/۹-۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از نانوذره مشتق اسپایرواکس ایندول در ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون برات در هر کدام از چاهکها، در هر ردیف تهیه گردید. ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی دارای کدورتی معادل کدورت نیم مک فارلند به چاهکها اضافه گردید. محیط کشت مولر هینتون برات با و بدون سوسپانسیون باکتری و همچنین یک چاهک حاوی دی متیل سولفواکساید (Dimethyl sulfoxide) (DMSO) (حلال نانوذره مورد بررسی) جهت بررسی خاصیت انتی باکتریال احتمالی حلال در نظر گرفته شدند. میکروپلیتها به مدت ۲۴ ساعت دردمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری گردیدند. کدورت تمام چاهکها با استفاده از دستگاه قرائت گرالایزا در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانش شد. پایین ترین غلظتی که از رشد باکتری جلوگیری کرد و فاقد کدورت بود به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) (Minimum Inhibitory Concentration) ماده ضد میکروبی در نظر گرفته شد. این آزمایش ۳ بار تکرار گردید و میانگین داده های به دست آمده به عنوان MIC تعیین گردید. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) (Minimum Bactericidal Concentration) به میزان ۵ میکرولیتر از چاهک هایی که رشد باکتری در آن ها متوقف شده است برداشته شد و به پلیت های حاوی محیط مولر هینتون آگار فاقد نانو ذره مورد نظر منتقل گردید و به مدت ۲۴ ساعت دردمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. سپس با بررسی پلیت‌ها، پایین ترین غلظتی که در آن ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها رشد نداشتند به عنوان MBC در نظر گرفته شد.

وسیله مهار کننده بتالاکتامازی مهار نمی‌شود، به عنوان مولدین بتالاکتامازهای نوع AmpC محسوب می‌شوند. در این ازمون از سویه استاندارد/شرشیا کلی ۲۵۹۲۲ ATCC نیز عنوان کنترل مثبت به کار گرفته شد. سنتز نانو ذره ۲-آمینو-۷-دی متیل-۵-دی اکسو-۵،۶،۷-تتراهیدرو اسپایرو (کرومن-۳،۴-ایندولین)-۳-کربونیتریل با روش الکتروسنتز: جهت تهیه مشتق جدید اسپایرواکس ایندول، مخلوطی از دایمدون (۱ میلی مول، ۰/۱۴۰ گرم)، مالونونیتریل (۲ میلی مول، ۰/۰۶۶ گرم)، آیزاتین (۳ میلی مول، ۰/۱۴۷ گرم)، سدیم بروماید (۰/۵ میلی مول، ۰/۵۱۰ گرم) و ۲۵ میلی لیتر پروپانول به مدت ۹۰ دقیقه با جریان ثابت ۰/۵ آمپر در ۵۰° C روی همزن مغناطیسی همگن شدند (شکل ۲). بعد از کامل شدن واکنش، روش کروماتوگرافی لایه نازک (n-هگزان/تانول: ۳/۱) به کار گرفته شد. سپس به محصول، ۲۰ میلی لیتر اتانول ۸۰٪ اضافه گردید و رسوبات حاصل با سانتریفیوژ جدا شدند. به منظور تایید مورفولوژی نانوذره از تکنیک میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) (Scanning Electron Microscope) استفاده شد. در این روش، مورفولوژی نانوذرات پس از پوشش دهی با طلا به وسیله آنالایزر axl30 در ولتاژ ۲۰ کیلووات، مورد بررسی قرار گرفتند (۱۴).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) نانوذرات -آمینو-۷،۷-دی متیل-۲،۵-دی اکسو-۵،۶،۷-تتراهیدرو اسپایرو (کرومن-۳،۴-ایندولین)-۳-کربونیتریل علیه ایزوله‌های /شرشیاکلی مولد ESBLs: به منظور تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی نانوذرات مشتق اسپایرواکس ایندول سنتز شده در تحقیق حاضر، روش میکرودایلوشن برات در چاهک ۹۶ خانه ای به کار گرفته شد (۱۵). ابتدا،



شکل ۲- سنتز اسپایرواکس ایندول: ۲-آمینو-۷،۷-دی متیل-۵،۵-دی اکسو-۵،۶،۷-تتراهیدرو اسپایرو (کرومن-۳،۴-ایندولین)-۳-کربونیتریل

یافته‌ها

ایزوله از ۶۰ ایزوله/اشریشیا کلی مولد ESBLs بودند. جدول ۳، تعداد ایزوله‌های اشریشیا کلی مقاوم به بیش از دو آنتی‌بیوتیک و الگوی مقاومتی آنها را نشان می‌دهد. نتیجه بررسی مورفولوژی نانوذره نانو ۲-آمینو-۷،۷-دی‌متیل-۲،۱-۵-دی‌اکسو-۸،۷،۶،۵-تتراهیدرواسپایرو (کرومن-۳،۴-ایندولین)-۳-کربونیتریل: نتایج بررسی با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) نشان داد که نانوذره سنتز شده، کروی می‌باشد و میانگین سایز ذرات زیر ۱۰۰ نانومتر است (شکل ۳).

تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) و

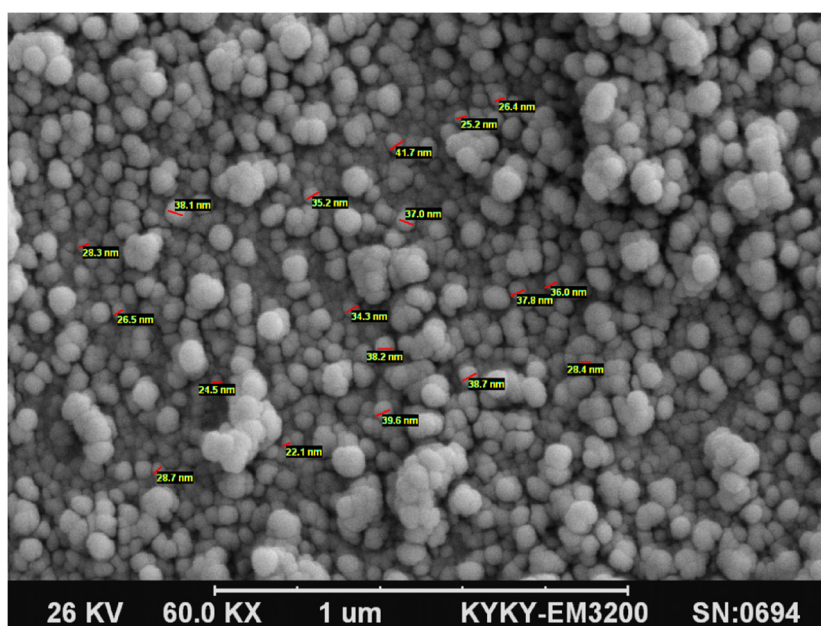
نتایج جداسازی و شناسایی ایزوله‌های اشریشیا کلی: از نمونه‌های ادراری جمع‌آوری شده، ۶۰ ایزوله/اشریشیا کلی جداسازی و با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی رایج تایید شدند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها و تایید فنوتیپی ایزوله‌های مولد ESBLs: نتایج بررسی آنتی‌بیوتیک‌های سفتراییدیم، سفتریاکسون، سفوتاکسیم و سفپیم روی ایزوله‌های اشریشیا کلی در جدول ۲، مشخص شده است. در بررسی فنوتیپی ایزوله‌های مولد ESBLs، ۱۴

جدول ۲- بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های اشریشیا کلی

تعداد ایزوله‌ها	مقاوم	حساس	میان
آنتی بیوتیک‌ها	۱۰	۴۲	۸
سفتراییدیم	۱۸	۴۰	۲
سفتریاکسون	۱۹	۳۹	۲
سفوتاکسیم	۱۴	۴۴	۲
سفپیم			

جدول ۳- الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های مقاوم به چند دارو اشریشیا کلی

تعداد ایزوله‌های مقاوم	آنتی بیوتیک
۷	سفتراییدیم (CAZ) - سفوتاکسیم (CTX) - سفتریاکسون (CRO) - سفپیم (FEP)
۱	سفتریاکسون (CRO) - سفوتاکسیم (CTX) - سفتراییدیم (CAZ)
۸	سفپیم (FEP) - سفوتاکسیم (CTX) - سفتریاکسون (CRO)
۸	سفوتاکسیم (CTX) - سفتریاکسون (CRO)
۲۴	جمع



شکل ۳- تصویر SEM نانوذره ۲-آمینو-۷،۷-دی‌متیل-۲،۱-۵-نیترو-۵-آمینو-۷،۷-دی‌اکسو-۸،۷،۶،۵-تتراهیدرواسپایرو(کرومن-۳،۴-ایندولین)-۳-کربونیتریل (۱۴)

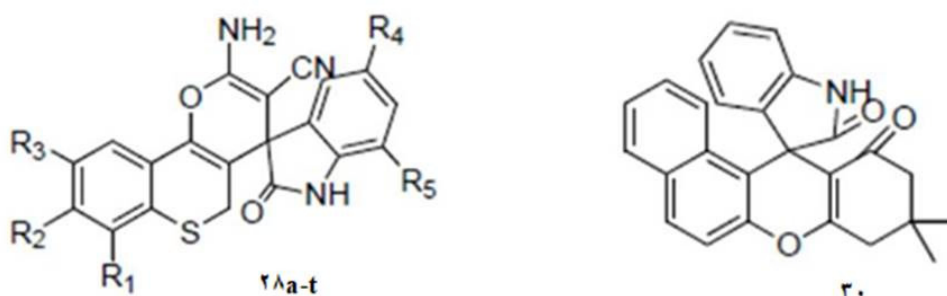
ایندولین-۳- کربونیتریل) با استفاده از روش الکتروستنتز، مستقیماً از مواد اولیه به شکل نانو سنتز شد. این در حالی است که تاکنون اثرات بیولوژیکی این دسته از ترکیبات به فرم نانو مورد بررسی قرار نگرفته است. در این تحقیق برای اولین بار اثر بازدارندگی این نانو ذره علیه ایزوله‌های /شرشیا کلی مولد ESBLs جدا شده از نمونه‌های ادراری در شهر کرج مورد بررسی قرار گرفت.

در مجموع ۶۰ ایزوله /شرشیا کلی از نمونه‌های ادرار جمع‌آوری شده از بیماران تعدادی از بیمارستان‌های شهر کرج جداسازی و شناسایی شدند و سپس با استفاده از روش انتشار دیسک در اگار، ایزوله‌ها از نظر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم، سفتریاکسون، سفنازیدیم و سفوتاکسیم مورد غربالگری اولیه قرار گرفتند که ۲۳/۳۳٪ به سفپیم، ۳۰٪ به سفتریاکسون، ۱۶/۶۶٪ به سفنازیدیم و ۳۱/۶۶٪ به سفوتاکسیم مقاومت نشان دادند. همچنین در تحقیق حاضر بررسی‌ها نشان داد، ۴۰٪ ایزوله‌ها به بیش از دو آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. به این ترتیب که ۳۳/۳۳٪ به سفوتاکسیم (CTX) - سفتریاکسون (CRO)، ۳۳/۳۳٪ به سفپیم (FEP) - سفوتاکسیم (CTX) - سفتریاکسون (CRO)، ۲۹/۱۶٪ به سفنازیدیم (CAZ) - سفوتاکسیم (CTX) سفتریاکسون (CRO) و ۱/۴٪ به سفتریاکسون (CRO) - سفوتاکسیم (CTX) - سفنازیدیم (CAZ) همزمان مقاومت نشان دادند. نتایج تست تایید فنوتیپی (دیسک ترکیبی) ایزوله‌های /شرشیا کلی از نظر تولید ESBLs نشان داد که ۲۳/۳٪ آنها مولد ESBLs هستند. به واسطه اهمیت /شرشیا کلی در بروز عفونت‌های ادراری و مقاومتهای چندگانه آنتی‌بیوتیکی گزارش شده، مطالعاتی در خصوص میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری و همچنین تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف توسط آن در نقاط مختلف ایران و سایر کشورها انجام گرفته است. واسف و همکاران در سال ۲۰۱۴ در دانشگاه قاهره گزارش کردند از میان ۱۰۷۳ ایزوله /شرشیا کلی ۴۱/۹٪ مولد ESBLs بودند (۱۷). منوچهری و همکاران در سال ۲۰۱۵ ضمن مطالعه ای دریافتند که از ۱۲۰ ایزوله /شرشیا کلی بدست آمده از نمونه‌های ادرار بیماران در مازندران مبتلا به عفونت ادراری، ۵۵٪ مولد

حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانوذرات مشتق اسپایرواکس ایندول: با توجه به نتایج روش برات میکروداپلوشن، غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانو ذره ۲-آمینو-۷،۷-دی متیل-۲-۵-دی اکسو-۸،۷،۶،۵-تتراهیدرواسپایرو (کرومن-۴-۳-ایندولین)-۳-کربونیتریل نه تنها از رشد باکتریها جلوگیری کرد بلکه این غلظت منجر به از بین رفتن باکتریها نیز شد؛ بنابراین، مقدار MIC نانوذرات مورد بررسی معادل مقدار MBC آن بدست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری

مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در میان باکتری‌های پاتوژن موضوعی است که امروزه به عنوان یک مشکل در سراسر جهان مورد توجه است. عفونت دستگاه ادراری از شایع‌ترین عفونت‌ها محسوب می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی از جمله سفالوسپورین‌ها در درمان عفونت ادراری مورد استفاده قرار می‌گیرند. در سالهای اخیر مقاومت نسبت به سفالوسپورین‌ها به دلیل تولید ESBLs افزایش یافته است. انتقال و انتشار سریع ارگانیسم‌هایی که قادر به تولید ESBLs هستند باعث بالا رفتن میزان عفونت‌های بیمارستانی در سراسر جهان شده است (۱۶). یکی از عوامل اصلی مولد عفونت ادراری، باکتری /شرشیا کلی می‌باشد. مقاومت‌های چندگانه آنتی‌بیوتیکی این باکتری، مشکلات پیچیده‌ای را برای درمان‌های تجربی عفونت‌های ناشی از آن ایجاد کرده است. بعلاوه، سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های ایجادکننده عفونت دستگاه ادراری از کشوری به کشور دیگر متغیر است (۱۷)؛ بنابراین، توسعه عوامل ضد میکروبی موثر جدید، به ویژه بر پایه نانوتکنولوژی هنوز مورد نیاز می‌باشد. اسپایروسیکلیکها، ترکیبات دارای ساختار کایرال غیرقطبی، به عنوان عوامل چندکاره در مولکولهای زیستی مورد توجه قرار گرفته‌اند. به طور ویژه، اسپایرواکس ایندول‌ها که به فراوانی در محصولات الی یافت می‌شوند به اهداف سنتتیک قابل توجه تبدیل شده‌اند و به دلیل دارا بودن فعالیت‌های بیولوژیکی مطلوب، در سنتزالی رایج هستند (۱۸). در این تحقیق مشتقی از ترکیبات اسپایرواکس ایندول (۲-آمینو-۷،۷-دی متیل-۲-۵-دی اکسو-۸،۷،۶،۵-تتراهیدرواسپایرو (کرومن-۴-۳-



شکل ۴- مشتقاتی از اسپایرواکس ایندولها (۲۳، ۲۴)

کردند و گزارش کردند که این مشتق دارای خاصیت ضدقارچی مطلوبی علیه کریپتوکوکوس نئوفورمنس، اپیدرموفیتون فلوکوزوم و موکور راسموس به ترتیب با مقادیر MIC ۱۶،۸،۱۶ $\mu\text{g/mL}$ بود (۲۲). همچنین Wu و همکارانش در سال ۲۰۱۶ اسپایرواکس ایندول تتراهیدرو پیران (شکل ۴) را در پروپانول سنتز کردند که علیه استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس البوس، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس سرئوس، میکروکوکوس تتراژنوس و اشریشیا کلی فعالیت موثری را نشان دادند که مقادیر MIC به ترتیب معادل $\mu\text{g/mL}$ ۱۰، ۸، ۱۰، ۷، ۱۰ و ۱۰ بودند (۲۳).

مطالعه ای در راستای تحقیق حاضر توسط Ramadoss و همکارانش در سال ۲۰۱۶ (۲۴) صورت گرفته است که مشتقاتی از اسپایرواکس ایندول معمولی (جدول ۴ (a,b,c)) نه به فرم ذرات نانو را از ایزاتین، مالونونیتریل و ترکیبات ۳،۱-دی کربونیل حلقوی از طریق واکنش های چند جزئی تک مرحله ای سبز سنتز کردند که از نظر دارا بودن استخلافهای فلئور (a)، برم (b) و کلر (c) به جای هیدروژن روی حلقه اریل بخش اکس ایندول از مشتق مورد مطالعه این تحقیق متفاوت بودند. مشتقات سنتز شده از نظر خاصیت ضد میکروبی علیه اشریشیا کلی، کلبسیلا نمونیه و سودوموناس اتروجینوزا با استفاده از روش تهیه رقت سریال در آگار بررسی شدند. تمامی ترکیبات دارای خاصیت ضد باکتریایی با رنج MIC معادل $\mu\text{g/mL}$ ۱۵۰ - ۵۰ علیه هر سه جنس باکتریایی مورد آزمایش بودند. نتایج بررسی خاصیت ضد باکتریایی آنها در مقایسه با مشتق سنتز شده در این تحقیق (جدول ۴ (e)) علیه اشریشیا کلی به صورت $c < b < a < e$

ESBLs بودند (۱۹). در مطالعه ای که توسط رحیم آبادی و همکاران در سال ۲۰۱۵ صورت گرفت، مشخص شد از ۱۹۵/اشریشیا کلی جدا شده از نمونه های اداری بیماران چند بیمارستان رشت، ۳۶/۹۲٪ آنها مولد ESBLs هستند (۲۰). زابلی و همکاران در مطالعه ای در سال ۲۰۱۶ بر روی ۸۴ ایزوله اشریشیا کلی نشان دادند که ۵۴ مورد از ایزوله ها تولید کننده ESBLs می باشند که ۴۵٪ نمونه ها را تشکیل میدهد (۲۱)؛ بنابراین لزوم بکارگیری ترکیبات ضد میکروبی جدید جایگزین، برای کنترل این دسته از باکتری ها می بایست در اولویت اهداف درمانی قرار بگیرد.

در این مطالعه، نانوذره یه مشتق جدید اسپایرواکس ایندول به روش الکترو سنتز ساخته شد و پس از تایید مورفولوژی آن با استفاده از تکنیک میکروسکوپ الکترونی SEM، فعالیت ضدباکتریایی غلظت های مختلف مشتق نانو اسپایرواکس ایندول سنتز شده علیه ایزوله های اشریشیا کلی مولد ESBLs به روش میکرو دیلوشن برات بررسی شد. با توجه به نتایج این تست، کمترین غلظت این نانوذره که در آن هیچ رشدی مشاهده نشد یا به عبارت دیگر، MIC این نانوذره معادل $\mu\text{g/mL}$ ۵۰ بود؛ بنابراین مشخص شد که مشتق سنتز شده دارای فعالیت ضدباکتریایی مطلوبی علیه ایزوله های اشریشیا کلی مولد ESBLs می باشد؛ بنابراین، این ترکیب پس از بررسی های تکمیلی می تواند پتانسیل استفاده در درمان را داشته باشد. از مطالعات مرتبط، مطالعه Song و همکارانش در سال ۲۰۱۶ می باشد که مشتقی از اسپایرواکس ایندول به نام پلی سیکلیک اسپایرواکس ایندول تتراهیدرو پیران (شکل ۴-۲۸a-t) را با روش چند جزئی تک مرحله ای سنتز

جدول ۴- مقایسه حداقل غلظت ممانعت کننده (MIC) از رشد مشتقات مختلف اسپایرواکس ایندول مطالعه Ramadoss و همکارانش (۲۰۱۶) (a-c) [۲۵] و نانوذره مشتق سنتز شده در مطالعه حاضر (e) علیه *شرشیا کلی*

کد ترکیب	نام ترکیب	ساختار شیمیایی ترکیبات	کمترین غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) ($\mu\text{g/mL}$)
			<i>E. coli</i>
a	۲-آمینو-۵'-فلورو-۷،۷-دی متیل-۳'- ۵-دی اکسو-۸،۵،۶- تتراهیدرواسپایرو(کرومن-۳،۴- ایندولین)-۳-کربونیتریل ^۱		۱۰۰
b	۲-آمینو-۵'-برمو-۷،۷-دی متیل-۳'- ۵-دی اکسو-۸،۵،۶- تتراهیدرواسپایرو(کرومن-۳،۴- ایندولین)-۳-کربونیتریل ^۲		۱۲۵
c	۲-آمینو-۵'-کلرو-۷،۷-دی متیل-۳'- ۵-دی اکسو-۸،۵،۶- تتراهیدرواسپایرو(کرومن-۳،۴- ایندولین)-۳-کربونیتریل ^۳		۱۵۰
e	۲-آمینو-۷،۷-دی متیل-۳'- ۵-دی اکسو-۸،۵،۶- تتراهیدرواسپایرو(کرومن-۳،۴- ایندولین)-۳-کربونیتریل ^۴		۵۰

1. 2-Amino-5'-fluoro-7,7-dimethyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tetrahydrospiro [chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile
2. 2-Amino-5'-bromo-7,7-dimethyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tetrahydrospiro [chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile
3. 2-amino-5'-chloro-7,7-dimethyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tetrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile
4. 2-amino-7,7-dimethyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tetrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile

است. شایان ذکر است که جهت تایید بیشتر نتایج بدست آمده می بایست مطالعات وسیعی در شرایط *in vivo* صورت گیرد.

نانوذرات در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های متداول مزیت‌های فراوانی در کاهش اثرات جانبی داروها، مقاومت و هزینه‌های درمان عرضه می کنند. استفاده از نانوذرات می تواند به طراحی مواد ضد میکروبی کمک کند و امید تازه ای برای روش های درمانی جدید علیه معضلات و تهدیدات باکتریایی باشند. با این حال برای اطمینان بیشتر جهت استفاده از این ترکیبات ضد میکروبی به مطالعات گسترده تری نیازمندیم. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد، نانوذره اسپایرواکس ایندول سنتز شده دارای اثر بازدارندگی علیه ایزوله‌های

می باشد. اگر چه مشتقات مطالعه فوق الذکر خاصیت ضدباکتریایی مطلوبی را علیه باکتری‌های مورد مطالعه نشان دادند اما اینکه آیا علیه *شرشیا کلی* های مولد ESBLs نیز از اثر ممانعت کنندگی کافی برخوردار هستند، مطالعه‌ای صورت نگرفته است. مشتق سنتز شده در تحقیق حاضر در مقایسه با مشتقات اسپایرواکس ایندول مطالعه فوق، نه تنها از نظر خاصیت ضدباکتریایی قوی تر بود بلکه علیه *شرشیا کلی* های مولد ESBLs که امروزه به عنوان یک عامل تهدید کننده سلامت بشر محسوب می شوند نیز اثر بخش بود. از دلایل این برتری در خاصیت ضد میکروبی احتمالا مربوط به اندازه بسیار ریز و نسبت سطح به حجم بالای این ذرات می باشد که از ویژگی‌های مطلوب نانوذرات

infectious diseases by nanoparticles surface functionalized with special biomolecules. *Curr Med Chem*. 2012;19(19):3196-3202.

9. Aljani Z, Talebian N, Douli M. Bactericidal activity of copper oxide nanocomposite/bioglass for in vitro clindamycin release in implant infections due to staphylococcus aureus. *Avicenna J Med Biochem*. 2016;4:1-10.

10. Bhaskar G, Arun Y, Balachandran C, Saikumar C, Perumal PT. Synthesis of novel spirooxindole derivatives by one pot multicomponent reaction and their antimicrobial activity. *Eur J Med Chem*. 2012;51:79-91.

11. Yu B, Yu DQ, Liu HM. Spirooxindoles: Promising scaffolds for anticancer agents. *Eur J med chem*. 2015;97:673-98.

12. Bhaskar G, Arun Y, Balachandran C, Saikumar C, Perumal PT. Synthesis of novel spirooxindole derivatives by one pot multicomponent reaction and their antimicrobial activity. *Eur J med chem*. 2012;51:79-91.

13. Barbosa TM, Levy SB. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist Updates*. 2000;3(5):303-11.

14. Darvish ZM, Mirza B, Makarem S. Electrocatalytic multicomponent reaction for synthesis of nanoparticles of spirooxindole derivatives from isatins, malononitrile, and dimedone. *J Heterocycl Chem*. 2017;54(3):1763-6.

15. Balouri M, Sadiki M, Koraichi S. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharma Analys*. 2016;6:71-79.

16. Demirel I, Kinnunen A, Önnberg a, Söderquist B, Persson K. Comparison of host response mechanisms evoked by extended spectrum beta lactamase (ESBL) and non-ESBL producing uropathogenic *E. coli*. *BMC Microbiol*. 2013;13(181):1471-2180.

17. Molazade A, Gholami MS, Shahi A, Najafipour S, Mobasheri F, Mansuri A. Evaluation of Antibiotic Resistance Pattern of Isolated Gram-Negative Bacteria from Urine Culture of Hospitalized patients in Different Wards of Vali-Asr Hospital in Fasa During the Years 2012 and 2013. *J Fasa Uni Med Sci*. 2014;4(2).

18. Yang YT, Zhu JF, Liao G, Xu HJ, Yu B. The development of biologically important spirooxindoles as new antimicrobial agents. *Curr Med Chem*. 2018;25(19):2233-44.

19. Wassef M, Behiry I, Younan M, EL Guindy N, Mostafa S, Abada E. Genotypic identification Of AmpC beta-lactamase production in gram-negative bacilli isolates. *Jundishapuer J Microbiol*. 2014;7(1):1-9.

20. Manouchehri M, Ahanjan M. Detection of CTX beta-lactamase gene in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection using polymerase chain reaction. *J Mazandaran Uni Med Sci*.

اشریشیا کولای مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف می باشد. اگرچه، مطالعه حاضر فقط به ارزیابی اولیه فعالیت ضد میکروبی نانو ذره اسپایرواکس ایندول پرداخته است، اما با مطالعات بیشتر می توان مواد ضد میکروبی جدید بر پایه این نوع مشتقات را طراحی کرد.

تقدیر و تشکر

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج جهت حمایت از این تحقیق سپاسگزاری می گردد.

References

1. Koseoglu O, Kocaguz S, Gur D, Akova M. Nosocomial bloodstream infection in Turkish university hospital: Study of Gram-negative bacilli and their sensitivity patterns. *Int J Antimicrob Agents*. 2001;17(6):477-481.

2. Patel JP, Cockerill FR, Bradford PA, Eliopoulos GM, Hindler A. Laboratory Standards Institute, Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-second Information Supplement, Wayne, Pennsylvania, Clinical Laboratory Standards Institute Document M100-S22; 2012. p: 1-188.

3. Galliford CV, Scheidt KA. Pyrrolidinyl spirooxindole natural products as inspirations for the development of potential therapeutic agents. *Angewandte Chemie International Edition*. 2007;46(46):8748-58.

4. Hong L, Wang R. Recent Advances in Asymmetric Organocatalytic Construction of 3, 3'-Spirocyclic Oxindoles. *Adv Synthes Catalys*. 2013;355(6):1023-52.

5. Arun Y, Saranraj K, Balachandran C, Perumal PT. Novel spirooxindole-pyrrolidine compounds: Synthesis, anticancer and molecular docking studies. *Eur J Med Chem*. 2014;3:74:50-64.

6. Smith PW, Sollis SL, Howes PD, Cherry PC, Starkey ID, Cobley KN, et al. Dihydro-pyranocarboxamides related to zanamivir: A new series of inhibitors of influenza virus sialidases. 1. Discovery, synthesis, biological activity, and structure- activity relationships of 4-guanidino-and 4-amino-4 H-pyran-6-carboxamides. *J Med Chem*. 1998;41(6):787-97.

7. Hiramoto K, Nasuhara A, Michikoshi K, Kato T, Kikugawa K. DNA strand-breaking activity and mutagenicity of 2, 3-dihydro-3, 5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP), a Maillard reaction product of glucose and glycine. *Mut Res/Genetic Toxicol Environ Mutagen*. 1997;395(1):47-56.

8. Sundar S, Kumar Prajapati V, Drug targeting to

2015;25(129):36-45.

21. Asadpour K, Hashemitabar Gh, Mojtahedi A. Antibiotic-resistance Patterns in E.coli Isolated from Patients with Urinary Tract Infection in Rasht. J Guilan Uni Med Sci. 2016;96 (22-29).

22. Mansuri A. Evaluation of antibiotic resistance pattern of isolated gram-negative bacteria from urine culture of hospitalized patients in different wards of vali-asr hospital in Fasa during the years 2012 and 2013. J Fasa Uni Med Sci. 2014;4(3):275-83.

23. Guan Z, Guochao L, Yifan Z, Xiaoyan H, Guofeng C, Yali S. Ultrasound promoted synthesis of novel substituted spirooxindole compounds containing thiochroman moiety with antifungal activity. Chinese J Organ Chem. 2016;36(1):143-50.

24. Du-Lin K, Jie J, Lu-Yong W, Xiang-Hui W, Zai-Feng S, Ming-Shu W, et al. Synthesis, Structure and Antimicrobial Activity of 9, 9-Dimethyl-9, 10-dihydrospiro [benzo [a]-xanthene-12, 3'-indoline]-2', 11 (8H)-dione. Chinese J Struct Chem. 2016;35(1849-1854).

25. Ramadoss H, Saravanan D, Sudhan SP, Mansoor SS. Synthesis and antimicrobial evaluation of diversely substituted spirooxindole derivatives. Der Pharma Lett. 2016;8(1):25-9.