



## بررسی اثر ضدبacterیایی نانو ذره مشتق جدید اسپایروواکس ایندول روی ایزووله‌های اشرشیا کلی مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف از بیماران مبتلا به عفونت ادراری بیمارستان‌های شهر کرج

پرسنلو سعادتی: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

اکرم سادات طباطبایی بفروی: استادیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (\* نویسنده مستول)  
a.tabatabae@iaut.ac.ir

لیلا جبل 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 اسپایروواکس ایندول، اشرشیاکلی، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، عفونت دستگاه ادراری

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۶/۰۹  
تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۱۲

**زمینه و هدف:** به دلیل افزایش عفونت دستگاه ادراری ناشی از سویه‌های اشرشیاکلی 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 ضدبacterیایی نانوذره یک مشتق جدید اسپایروواکس ایندول علیه ایزووله‌های اشرشیاکلی مولد ESBLs از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری قرار گرفت.

**روش کار:** این مطالعه مشاهدی - توصیفی روی ۶۰ ایزووله اشرشیاکلی بدست امده از بیمارستان‌های شهر کرج، انجام شد. ایزووله‌ها با آزمون‌های استاندارد بیوشیمیابی شناسایی شدند. حساسیت ضد میکروبی ایزووله‌ها نسبت به سفپیم، سفتازیدیم، سفتریاکسون و سفوتوکسیم توسط روش انتشار دیسک سنجیده شد. مولدهای بتالاکتامازهای وسیع الطیف توسط آزمون دیسک ترکیبی شناسایی شدند. نانوذرات مشتق جدید اسپایروواکس ایندول با روش الکتروسترنز امده شدند و توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره بررسی شدند. روش میکرودایلوشن براث جهت تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) نانوذرات به کار گرفته شد.

**یافته‌ها:** مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۶۰ ایزووله عبارتند از: سفپیم ۲۳/۲۳٪، سفتازیدیم ۱۶/۶۶٪، سفتریاکسون ۳۰٪ و سفوتوکسیم ۳۱٪/۶۶٪. بر اساس آزمون تایید فنوتیپی، ایزووله به عنوان اشرشیاکلی مولد ESBLs شناسایی شدند. مقدار MIC نانوذرات اسپایروواکس ایندول مورد مطالعه  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  بودست امده.

**نتیجه‌گیری:** با انجام مطالعات بیشتر، می‌توان نانوذره اسپایروواکس ایندول مورد مطالعه را به عنوان یک ترکیب ضدبacterیایی جدید معرفی کرد.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.  
**منبع حمایت کننده:** دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

#### شیوه استناد به این مقاله:

Saadati P, Tabatabae Bafroee AS, Jabalameli L, Makarem S. Evaluating the antibacterial effect of a new spirooxindole derivative nanoparticle on Extended Spectrum  $\beta$ -Lactanases (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 [CC BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/) صورت گرفته است.



Original Article

## Evaluating the antibacterial effect of a new spirooxindole derivative nanoparticle on Extended Spectrum $\beta$ -Lactanases (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 Tabatabaei Bafroee**, Assistant Professor of Microbiology, Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (\* Corresponding author) [a.tabatabaei@iauet.ac.ir](mailto:a.tabatabaei@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  $\beta$ -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 $\mu$ 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, Kraj Branch

### Keywords

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

Received: 31/08/2019

Accepted: 01/02/2020

### Cite this article as:

Saadati P, Tabatabaei Bafroee AS, Jabalameli L, Makarem S. Evaluating the antibacterial effect of a new spirooxindole derivative nanoparticle on Extended Spectrum  $\beta$ -Lactanases (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.



## مقاله پژوهشی

## مقدمه

ویژگی‌های سازگاری قابل توجه و ساختارهای سه بعدی منحصربه‌فرد و وفورشان در محصولات طبیعی متعدد و مولکول‌های فعال بیولوژیکی، مورد توجه خاصی قرار گرفته‌اند. مشخصه ساختاری کلیدی این ترکیبات، حلقه اسپاپرورو متصل به موقعیت C<sub>3</sub> هسته اکس ایندول با اشکال هتروسیکلیک متنوع می‌باشد. از آنجا که این اسپاپرواکس ایندولها همزمان دارای اکس ایندول و اشکال هتروسیک می‌باشند، به نظر می‌رسد کاندیداهای نویدبخش برای کشف دارو باشند (۴، ۳). مطالعات نشان داده‌اند، ترکیبات حاوی هسته اسپاپرواکس 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، سوبسترهاي 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 بهشت 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 اسپاپرواکس 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، ۱۳).

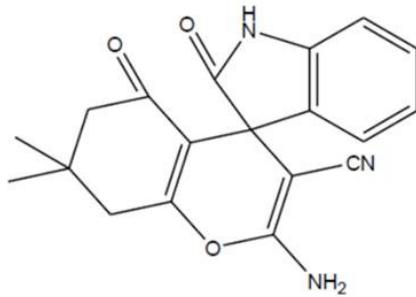
ولی تاکنون این دسته از ترکیبات به فرم نانو ذره مورد بررسی قرار نگرفته است؛ بنابراین در این تحقیق، مشتق جدیدی از اسپاپرواکس ایندولها (شکل ۱) به صورت نانو ذره سنتز شد و اثرات ضد باکتریایی آن روی ایزوله‌های اشريشيا کلی مولد ESBLs جدا شده از نمونه‌های ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری مورد بررسی قرار گرفت.

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 اشريشيا کولاوی 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 بتالاکتمازهای وسیع الطیف Extended Spectrum β-ESBLs (Lactanases) می‌باشد، آنزیم‌هایی که علاوه بر ایجاد مقاومت به پنی‌سیلین‌ها واسطه ایجاد مقاومت به طیف وسیعی از سفالوسپورین‌ها (نسل سوم) از جمله سفتازیدیم، سفوتابکسیم، سفتریاکسون و همچنین منو باکتم‌ها مانند آزترئونام محسوب می‌شوند. میزان تولید بتالاکتمازهای وسیع الطیف در انترباکتریاسه‌ها در سراسر جهان متفاوت می‌باشد. مطالعات نشان‌دهنده بیشترین میزان تولید ESBLs به ترتیب توسط کلبسیلا نمونیه و اشريشيا کلی می‌باشد (۱۰، ۱۱).

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 راه حل‌های 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 دهنده، به رسمیت شناخته شده است. ترکیبات اسپاپر و دلیل خواص بیولوژیکی برجسته،

**جدول ۱**- قطر هاله های مبنا برای تعیین میزان حساسیت آنتی بیوتیک سویه های انتروباکتریاسه

مقاآم (میلیمتر)	میانه (میلیمتر)	حساس (میلیمتر)	آنتی بیوتیک
<۱۴	۱۷-۱۵	>۱۸	سفپیم
<۱۴	۱۷-۱۵	>۱۸	سفتاژیدیم
<۱۴	۲۰-۱۴	>۲۱	سفتریاکسون
<۱۴	۲۲-۱۵	>۲۳	سفوتاکسیم



**شکل ۱-۲**- آمینو-۷-۶-دی متیل-۲-دی اکسو-۵-و-۷-و-۸-کربونیتریل تراهیدرو اسپایرو {کروم-۴-و-۳-ایندولین}-۳-کربونیتریل

## 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 اشريشیا 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 اشريشیا کلی، نمونه های ادرار بر روی محیط کشت مک کانکی اگار و ائوزین متیلن بلو کشت داده شدند و ایزوله ها با استفاده از تست های بیوشیمیایی متداول از جمله آزمایش احیاء نیترات، متیل رد- وزپروسکوور (MR-VP)، بررسی H2S-ایندول- حرکت (SIM) و سیمون سیترات (CS)، اوره و تخمیر گلوکز در محیط تریپل شوگر ایرن اگار (TSI) مورد بررسی قرار گرفتند (۱۳).

غربالگری ایزوله های مولد ESBLs به روش فنوتیبی: به منظور غربالگری اولیه ایزوله های مولد ESBLs از Disk diffusion method (Kirby bauer- Bauer) مطابق با دستورالعمل موسسه استاندارد CLSI استفاده شد (۲). بدین صورت که مایع تلقیح استاندارد شده (کد دورتی معادل ۰/۵ مکفارلنند) ایزوله های مورد مطالعه در محیط کشت مولرهینتون اگار تلقیح شدند. سپس دیسک های آنتی بیوتیک در فواصل مشخص روی محیط کشت قرار داده شدند و

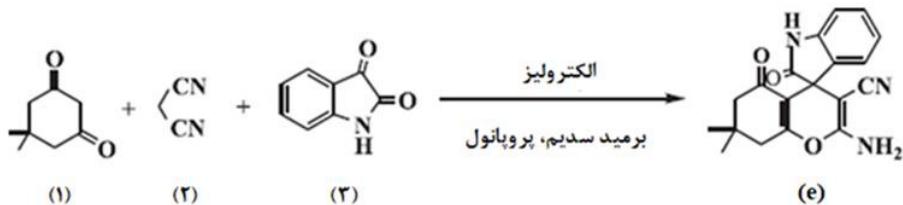
پلیتها به مدت ۱۶-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌گذاری گردیدند. پس از گذشت زمان گرم‌گذاری، قطر هاله عدم رشد به وسیله خط کش اندازه گیری و تفسیر آن با توجه به جدول CLSI برای اشريشیا کلی صورت گرفت (جدول ۱). سویه استاندارد سفتازیدیم (۱). E. coli ATCC ۲۵۹۲۲ نیز به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. آنتی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

تایید فنوتیبی ایزوله های مولد ESBLs: تولید ESBLs با استفاده از آزمون دیسک ترکیبی (Combined Disk test) تعیین گردید (۲). در این روش که مشابه ازمن انتشار دیسک در اگار صورت گرفت، از آنتی بیوتیک های سفتازیدیم (۳۰ µg)، سفتازیدیم - اسید کلاولانیک (۱۰/۳۰ µg)، سفوتاکسیم (۳۰ µg)، سفوتاکسیم - اسید کلاولانیک (۱۰/۳۰ µg) و سفترياکسون، سفترياکسون - اسید کلاولانیک استفاده شد. دیسک های آنتی بیوتیک به فاصله حداقل ۲۴ میلی متر از یکدیگر بر روی محیط قرار داده شدند. بعد از گرم‌گذاری به مدت ۱۶-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، هاله عدم رشد اطراف دیسک حاوی اسید کلاولانیک به عنوان مهار کننده آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف نسبت به بدون اسید کلاولانیک سنجیده شد. به طوری که اگر هاله عدم رشد اطراف دیسک های حاوی اسید کلاولانیک بزرگتر یا مساوی ۵ میلی متر نسبت به بدون اسید کلاولانیک 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 فنوتیبی 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 مولرهینتون براث 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 مولرهینتون براث با و بدون سوسپانسیون باکتری و همچنین یک چاهک 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) به میزان ۵ میکرولیتر از چاهک هایی که رشد باکتری در آن ها متوقف شده است برداشته شد و به پلیت های حاوی محیط مولرهینتون آگار فاقد نانو ذره مورد نظر منتقل گردید و به مدت ۲۴ ساعت دردمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. سپس با بررسی پلیت ها، پایین ترین غلظتی که در آن درصد باکتری ها رشد نداشتند به عنوان MBC در نظر گرفته شد.

وسیله مهار کننده بتالاکتامازی مهار نمی شود، به عنوان مولдин بتالاکتامازهای نوع AmpC محسوب می شوند. در این ازمون از سویه استاندارد/شرشیاکلی ۲۵۹۲۲ ATCC نیز عنوان کنترل مثبت به کار گرفته شد. سنتز نانو ذره ۲-آمینو-۷-دی متیل-۲-۵-دی اکسو-۵-و۷-۸-تتراهیدرو اسپایرو {کروم-۳-۴-ایندولین}-۳-کربونیتریل با روش الکتروسنتز: جهت تهیه مشتق جدید اسپایرواکس ایندول، مخلوطی از دایمدون (۱) میلی مول، (۱/۱۴۰ گرم)، مالونونیتریل (۲ میلی مول، ۰/۰۶۶ گرم)، آیزاتین (۳) میلی مول، (۰/۱۴۷ گرم)، سدیم بروماید (۵/۰ میلی مول، ۰/۵۱۰ گرم) و ۲۵ میلی لیتر پروپانول به مدت ۹۰ دقیقه با جریان ثابت ۵/۰ آمپر در ۵۰° روی همزن مغناطیسی همگن شدند (شکل ۲). بعد از کامل شدن واکنش، روش کروماتوگرافی لایه نازک (n-هگزان/اتanol: ۳/۱) به کار گرفته شد. سپس به محصول، ۲۰ میلی لیتر اتانول ۸٪ اضافه گردید و رسوبات حاصل با سانتریفیوژ جدا شدند. به منظور تایید مورفولوژی نانوذره از تکنیک میکروسکوپ الکترونی نگاره (Scanning Electron Microscope) استفاده شد. در این روش، مورفولوژی نانوذرات پس از پوشش دهی با طلا به وسیله انالاizer ۳۰ axl ۲۰ کیلووات، مورد بررسی قرار گرفتند (۱۴).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) نانوذرات- آمینو-۷،۷-دی متیل-۳،۵-دی اکسو-۸،۷،۶،۵-تتراهیدرو اسپایرو (کروم-۴،۳-ایندولین)-۳-کربونیتریل علیه ایزووله های/شرشیاکلی مولد ESBLs: به منظور تعیین کمترین غلظت مهار کننده نانوذرات مشتق اسپایرواکس ایندول سنتز شده در تحقیق حاضر، روش میکرودایلوشن براث در چاهک ۹۶ خانه ای به کار گرفته شد (۱۵). ابتدا،



شکل ۲- سنتز اسپایرواکس ایندول: ۲-آمینو-۷،۷-دی متیل-۳،۵-دی اکسو-۸،۷،۶،۵-تتراهیدرو اسپایرو (کروم-۴،۳-ایندولین)-۳-کربونیتریل

ایزوله از ۶۰ ایزوله/شرشیا کلی مولد ESBLs بودند. جدول ۳، تعداد ایزوله های/شرشیا کلی مقاوم به بیش از دو آنتی بیوتیک و الگوی مقاومتی انها را نشان می دهد. نتیجه بررسی مورفلوژی نانوذره نانو-۲-آمینو-۷،۷-دی متیل،۲'-۵-دی اکسو-۵،۸-۷،۶-تراهیدرواسپایرو (کروم-۴،۳'-ایندولین)-۳-کربونیتریل: نتایج بررسی با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) نشان داد که نانوذره سنتز شده، کروی می باشد و میانگین سایز ذرات زیر ۱۰۰ نانومتر است (شکل ۳).

تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) و

### یافته ها

نتایج جداسازی و شناسایی ایزوله های/شرشیا کلی: از نمونه های ادراری جمع آوری شده، ۶۰ ایزوله/شرشیا کلی جداسازی و با استفاده از تست های بیوشیمیایی رایج تایید شدند.

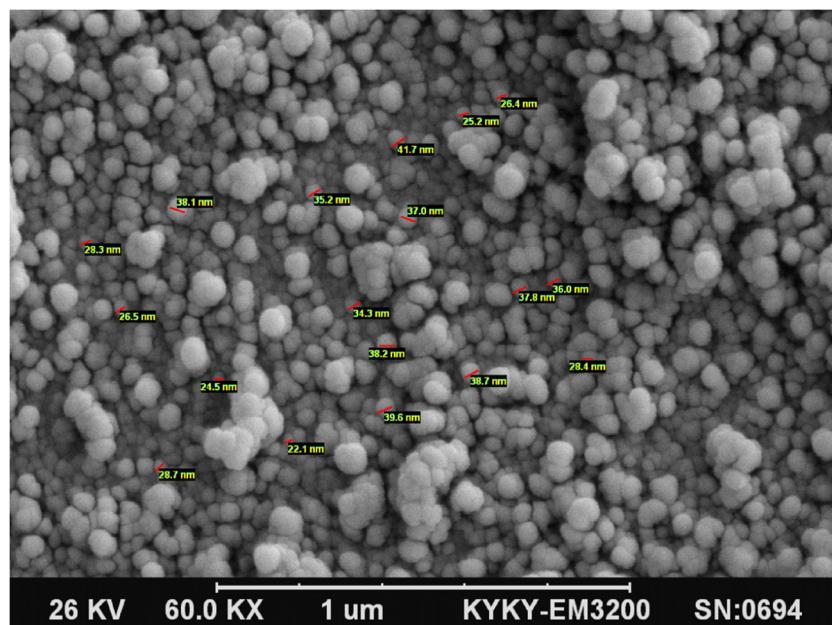
مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها و تایید فنوتیپی ایزوله های مولد ESBLs: نتایج بررسی آنتی بیوتیک های سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفوتابکسیم و سفپیم روی ایزوله های/شرشیا کلی در جدول ۲، مشخص شده است. در بررسی فنوتیپی ایزوله های مولد ۱۴، ESBLs

**جدول ۲**- بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله های اشريشیا کلی

تعداد ایزوله ها	میانه	حساس	مقاوم	آنٹی بیوتیک ها
۸	۸	۴۲	۱۰	سفتاژیدیم
۲	۲	۴۰	۱۸	سفتریاکسون
۲	۲	۳۹	۱۹	سفوتابکسیم
۲	۲	۴۴	۱۴	سفپیم

**جدول ۳**- الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در ایزوله های مقاوم به چند دارو/شرشیا کلی

آنٹی بیوتیک	تعداد ایزوله های مقاوم
سفتاژیدیم (CAZ) - سفوتابکسیم (CTX) سفتریاکسون (CRO) - سفپیم (FEP)	۷
سفتریاکسون (CRO) - سفوتابکسیم (CTX) - سفتازیدیم (CAZ)	۱
سفپیم (FEP) - سفوتابکسیم (CTX) - سفتریاکسون (CRO)	۸
سفوتاکسیم (CTX) - سفتریاکسون (CRO)	۸
جمع	۲۴



**شکل ۳**- تصویر SEM نانوذره ۲-آمینو-۵-نیترو-۵-دی متیل،۲'-۵-دی اکسو-۵،۸-۷،۶-تراهیدرواسپایرو(کروم-۴،۳'-ایندولین)-۳-کربونیتریل (۱۴)

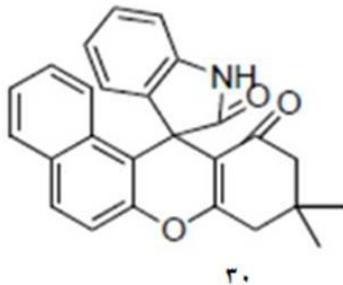
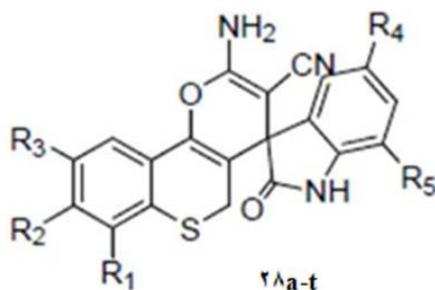
ایندولین)-۳-کربونیتریل) با استفاده از روش الکتروسنتز، مستقیماً از مواد اولیه به شکل نانو سنتز شد. این در حالی است که تاکنون اثرات بیولوژیکی این دسته از ترکیبات به فرم نانو مورد بررسی قرار نگرفته است. در این تحقیق برای اولین بار اثر بازدارندگی این نانو ذره علیه ایزوله‌های /شرشیا کلی مولد ESBLs جدا شده 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 آگار، ایزوله‌ها از نظر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفپیم، سفتراکسون، سفوتاکسیم و سفوتاکسیم مورد غربالگری اولیه قرار گرفتند که  $23/23$ % به سفپیم،  $30/30$ % به سفتراکسون،  $16/16$ % به سفتازیدیم و  $31/66$ % به سفوتاکسیم مقاومت نشان دادند. همچنین در تحقیق حاضر بررسی ها نشان داد،  $40/40$ % ایزوله‌ها به بیش از دو آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. به این ترتیب که  $33/33$ % به سفوتاکسیم (CTX) – سفتراکسون (CRO)،  $33/33$ % به سفپیم (FEP) – سفوتاکسیم (CTX) – سفپیم (FEP) و  $16/16$ % به سفتراکسون (CRO) – سفوتاکسیم (CTX) – سفتازیدیم (CAZ) همزمان مقاومت نشان دادند. نتایج تست تایید فنوتیپی (دیسک ترکیبی) ایزوله‌های /شرشیا کلی از نظر تولید ESBLs نشان داد که  $23/3$ % آنها مولد ESBLs هستند. به واسطه اهمیت /شرشیا کلی در بروز عفونتهاي ادراري و مقاومتهاي چندگانه آنتى‌بیوتیکي گزارش شده، مطالعاتي در خصوص ميزان مقاومت آنتى‌بیوتیکي اين باكتري و همچنین توليد بتلاكتامازهاي وسیع الطيف توسيط آن در نقاط مختلف ایران و سایر کشورها انجام گرفته است. واسف و همکاران در سال ۱۴۲۰ در دانشگاه قاهره گزارش کردند از ميان  $1073$  ایزوله /شرشیا کلی  $41/9$  مولد ESBLs بودند (۱۷). منوچهری و همکاران در سال ۱۵۲۰ ضمن مطالعه‌اي دریافتند که از  $20$  ایزوله /شرشیا کلی بدست امده از نمونه‌های ادرار بيماران در مازندران مبتلا به عفونت ادراري،  $55/55$ % مولد

حداقل غلظت کشنده‌گی (MBC) نانوذرات مشتق اسپايرواكس ايندول: با توجه به نتایج روش برات ميكرودايلوشن، غلظت  $50$  ميكروگرم بر ميلی ليتر نانو ذره  $2-آمينو-7,7-دي متيل-2',5-دي اكسو-5,5-تراباهيدرواسپاير (كرومن-4,4-ايندولين)-3-$  کربونیتریل نه تنها از رشد باكتريها جلوگيري کرد بلکه اين غلظت منجر به از بين رفتن باكتريها نيز شد؛ بنابراین، مقدار MIC نانوذرات مورد بررسی معادل مقدار آن بdest امد.

## بحث و نتیجه‌گيري

مقاومت نسبت به آنتى‌بیوتیک‌ها در میان باكتري‌های پاتوژن موضوعی است که امروزه به عنوان یک مشکل در سراسر جهان مورد توجه است. عفونت دستگاه ادراري از شایع ترین عفونت‌ها محسوب می‌شود. آنتى‌بیوتیک‌های مختلفی از جمله سفالوسپورین‌ها در درمان عفونت ادراري مورد استفاده قرار می‌گيرند. در سالهای اخیر مقاومت نسبت به سفالوسپورین‌ها به دلیل تولید ESBLs افزایش یافته است. انتقال و انتشار سريع 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 ادراري، باكتري /شرشیا کلی می‌باشد. مقاومت‌های چند گانه آنتى‌بیوتیکی این باكتري، مشکلات پیچیده ای را برای درمان‌هاي تجربی عفونت‌های ناشی از ایجاد کرده است. بعلاوه، سطح مقاومت آنتى‌بیوتیکی در بین سویه‌های ایجاد کننده عفونت دستگاه ادراري از کشوری به کشور دیگر متغير است (۱۷)؛ بنابراین، توسعه عوامل ضدミکروبی موثر جدید، به ویژه بر پایه نانوتکنولوژی هنوز موردنیاز می‌باشد. اسپايروسیکلیکها، ترکیبات دارای ساختار کایرال غیرقطبی، به عنوان عوامل چندگانه در مولکولهای زیستی مورد توجه قرار گرفته‌اند. به طور ویژه، اسپايرواكس ايندول‌ها که به فراوانی در محصولات الی یافت می‌شوند به اهداف سنتتیک قابل توجه تبدیل شده اند و به دلیل دارا بودن فعالیت‌های بیولوژیکی مطلوب، در سنتزالی رایج هستند (۱۸). در این تحقیق مشتقی از ترکیبات اسپايرواكس ايندول (۲-آمينو-7,7-دي متيل-2',5-دي اكسو-5,5-تراباهيدرواسپاير (كرومن-4,4-



**شکل ۴**- مشتقاتی از اسپاپرواکس ایندول‌ها (۲۳، ۲۴)

کردن و گزارش کردند که این مشتق دارای خاصیت ضدقارچی مطلوبی علیه کرپتوکوکوس نئوفورمنس، اپیدرموفیتون فلوکوزوم و موکور راسموس به ترتیب با مقادیر  $16\text{ }\mu\text{g/mL}$  MIC و  $16, 8, 16\text{ }\mu\text{g/mL}$  همچنین  $\text{Wu}$  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 تراژنوس و اشرشیا کلی فعالیت موثری  $\mu\text{g/mL}$  MIC به ترتیب معادل  $10, 8, 7, 10, 10$  بودند (۲۳).

مطالعه ای در راستای تحقیق حاضر توسط Ramadoss و همکارانش در سال ۲۰۱۶ (۲۴) صورت گرفته است که مشتقاتی از اسپاپرواکس 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 جزیی تک مرحله ای سبز سنتز کردند که از نظر دارا بودن استخلافهای فلورئور (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 اشیائی کلی، کلبسیلا نمونیه و سودوموناس اثروجینیوز/ با استفاده از روش تهیه رقت سریال در اگار بررسی شدند. تمامی ترکیبات دارای خاصیت ضد باکتریایی با رانج MIC معادل  $150\text{ }\mu\text{g/mL}$  -  $50$  علیه هر سه جنس باکتریایی مورد ازمایش بودند. نتایج بررسی خاصیت ضد باکتریایی انها در مقایسه با مشتق سنتز شده در این تحقیق (جدول e) علیه اش شناکر، به صورت  $\text{e} < \text{b} < \text{a}$  در مطالعه ای در راستای تحقیق حاضر توسط Ramadoss و همکارانش در سال ۲۰۱۶ (۲۴) صورت گرفته است که مشتقاتی از اسپاپرواکس 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 جزیی تک مرحله ای سبز سنتز کردند که از نظر دارا بودن استخلافهای فلورئور (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 اشیائی کلی، کلبسیلا نمونیه و سودوموناس اثروجینیوز/ با استفاده از روش تهیه رقت سریال در اگار بررسی شدند. تمامی ترکیبات دارای خاصیت ضد باکتریایی با رانج MIC معادل  $150\text{ }\mu\text{g/mL}$  -  $50$  علیه هر سه جنس باکتریایی مورد ازمایش بودند. نتایج بررسی خاصیت ضد باکتریایی انها در مقایسه با مشتق سنتز شده در این تحقیق (جدول e) علیه اش شناکر، به صورت  $\text{e} < \text{b} < \text{a}$

ESBLs بودند (۱۹). در مطالعه ای که توسط رحیم ابادی و همکاران در سال ۲۰۱۵ صورت گرفت، مشخص شد از ۱۹۵/۱ شرشیا کلی جدا شده از نمونه‌های ادراری بیماران چند بیمارستان رشت، ۳۶/۹۲٪ آنها مولد ESBLs هستند (۲۰). زابلی و همکاران در مطالعه ای در سال ۲۰۱۶ بر روی ۸۴ ایزوله اشترشیا کلی نشان دادند که ۵۴ مورد از ایزوله‌ها تولید کننده ESBLs می‌باشند که ۴۵٪ نمونه‌ها را تشکیل میدهد (۲۱)، بنابراین لزوم بکارگیری ترکیبات ضد میکروبی جدید جایگزین، برای کنترل این دسته از باکتری‌ها می‌باشد در اولویت اهداف درمانی قرار بگیرد.

در این مطالعه، نانوذره یه مشتق جدید اسپایرواکس ایندول به روش الکتروستنتز ساخته شد و پس از تایید مورفولوژی آن با استفاده از تکنیک میکروسکوپ الکترونی SEM، فعالیت ضدباکتریایی غلظت های مختلف مشتق نانوسایپایرواکس ایندول سنتز شده علیه ایزوله های اشرشیا کلی مولد ESBLs به روش میکرودایلوشن براث 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  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$  بود؛ بنابراین مشخص شد که مشتق سنتز شده دارای فعالیت ضدباکتریایی مطلوبی علیه ایزوله های اشرشیا 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) با روش حند حمزه، تک محله ای، سنتز

**جدول ۴**- مقایسه حداقل غلظت ممانعت کننده (MIC) از رشد مشتقات مختلف اسپایرواکس ایندول مطالعه Ramadoss و همکارانش (۲۰۱۶) (a-c) و نانوذره مشتق سنتز شده در مطالعه حاضر(۳) علیه/اشرشیا کلی

کد ترکیب	نام ترکیب	ساختار شیمیایی ترکیبات	کمترین غلظت ممانعت کننده از رشد (µg/mL) (MIC)
a	-آمینو-۵'-فلورو-۷,۷-دی متیل-۲'،۵-دی اکسو-۸-۵	تراهیدرواسپایرو(کروم-۴،۳'-ایندولین)-۳-کربونیتریل <sup>۱</sup>	۱۰۰
b	-آمینو-۵'-برمو-۷,۷-دی متیل-۲'،۵-دی اکسو-۸,۷,۶,۵	تراهیدرواسپایرو(کروم-۴،۳'-ایندولین)-۳-کربونیتریل <sup>۲</sup>	۱۲۵
c	-آمینو-۵'-کلرو-۷,۷-دی متیل-۲'،۵-دی اکسو-۸,۷,۶,۵	تراهیدرواسپایرو(کروم-۴،۳'-ایندولین)-۳-کربونیتریل <sup>۳</sup>	۱۵۰
e	-آمینو-۷,۷-دی متیل-۲'،۵-دی اکسو-۸,۷,۶,۵	تراهیدرواسپایرو(کروم-۴،۳'-ایندولین)-۳-کربونیتریل <sup>۴</sup>	۵۰

<sup>۱</sup>. 2-Amino-5'-fluoro -7,7-dimethyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tetrahydrospiro [chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile

<sup>۲</sup>. 2-Amino-5'-bromo -7,7-dimethyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tetrahydrospiro [chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile

<sup>۳</sup>. 2-amino-5'-chloro-7,7-dimethyl-2',5-dioxo-5,6,7,8-tetrahydrospiro[chromene-4,3'-indoline]-3-carbonitrile

<sup>۴</sup>. 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 امده می باشد مطالعات وسیعی در شرایط *in vivo* صورت گیرد.

نانوذرات در مقایسه با آنتیبیوتیک‌های متداول مزیت‌های فراوانی در کاهش اثرات جانبی داروها، مقاومت و هزینه‌های درمان عرضه می کنند. استفاده از نانوذرات می‌تواند به طراحی مواد ضد میکروبی کمک کند و امید تازه‌ای برای روش‌های درمانی جدید علیه مضاعلات و تهدیدات باکتریایی باشند. با این حال برای اطمینان بیشتر جهت استفاده از این ترکیبات ضد میکروبی به مطالعات گسترده‌تری نیازمندیم. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد، نانوذره اسپایرواکس ایندول سنتز شده دارای اثر بازدارندگی علیه ایزوکله‌های

می باشد. اگر چه مشتقات مطالعه فوق الذکر خاصیت ضد باکتریایی مطلوبی را علیه باکتری‌های مورد مطالعه نشان دادند اما اینکه ایا علیه/اشرشیا کلی‌های مولد ESBLs نیز از اثر ممانعت کننده‌گی 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 ضد باکتریایی قوی تر بود بلکه علیه/اشرشیا کلی‌های مولد ESBLs که امروزه به عنوان یک عامل تهدید کننده سلامت بشر محسوب می‌شوند نیز اثر بخش بود. از دلایل این برتری در خاصیت ضد میکروبی احتمالاً 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. Alavianian Z, Talebian N, Doudi 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. Balouiri 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, Mobasher 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.*

/اشريشيا کولاي مولد بتالاکتمازهای وسیع الطیف می باشد. اگرچه، مطالعه حاضر فقط به ارزیابی اولیه فعالیت ضد میکروبی نانو ذره اسپایروواکس 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 ازاد اسلامی واحد کرج جهت حمایت از این تحقیق سپاسگزاری می گردد.

## References

- 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.
- 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.
- 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.
- Hong L, Wang R. Recent Advances in Asymmetric Organocatalytic Construction of 3, 3'-Spirocyclic Oxindoles. *Adv Synthes Catalys.* 2013;355(6):1023-52.
- 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.
- Smith PW, Sollis SL, Howes PD, Cherry PC, Starkey ID, Cobley KN, et al. Dihydro-pyrancarboxamides 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.
- 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.
- Sundar S, Kumar Prajapati V, Drug targeting to

- 2015;25(129):36-45.
21. Asadpour K, Hashemitabar Gh, Mojtabaei 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.