

## Comparison of the Effects of *Hypericum perforatum* extract and its Microemulsion with *Aloe vera* Extract on *Brucella melitensis*

Mahsa Tabibnejad<sup>1</sup>, Mohammad Arjomandzadegan<sup>2</sup>, Mohammad Yousef Alikhani<sup>3</sup>, Maryam Sadrnia<sup>4,\*</sup>, Ghasem Habibi<sup>5</sup>, Zahra Naseri<sup>6</sup>

<sup>1</sup> MSc in Microbiology, Infectious Diseases Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor of Microbiology, Infectious Diseases Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

<sup>3</sup> Professor of Microbiology, Brucellosis Research Center, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

<sup>4</sup> Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Iran

<sup>5</sup> Medical Student, Infectious Diseases Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

<sup>6</sup> MSc in Microbiology, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion, Hamadan, Iran

\* **Corresponding Author:** Maryam Sadrnia, Department of Biology, Payame Noor University, Iran. Email: msadrnia@yahoo.com

### Abstract

**Received:** 19.08.2017

**Accepted:** 15.01.2018

#### How to Cite this Article:

Tabibnejad M, Arjomandzadegan M, Alikhani MY, Sadrnia M, Habibi G, Naseri Z. Comparison of the Effects of *Hypericum perforatum* extract and its Microemulsion with *Aloe vera* Extract on *Brucella melitensis*. *Avicenna J Clin Med.* 2018; 24(4): 336-344. DOI: 10.21859/ajcm.24.4.336.

**Background and Objective:** Today, due to the occurrence of drug resistance and the ability of bacteria to develop acute infections, investigating the antimicrobial effects of herbs has been proposed. Therefore, we aimed to examine the effects of *Hypericum perforatum* extract and microemulsion and *Aloe vera* extract on *Brucella* bacteria.

**Materials and Methods:** This experimental study was carried out with the help of a hood in a biosafety level 2 laboratory. Fifty blood serum samples were cultured in BACTEC for brucellosis, and if grown, they were transferred to *Brucella* Agar in an anaerobic jar containing 10-5% CO<sub>2</sub> for 48-72 h. Biochemical validation tests were carried out on the grown samples. Extraction was performed by a reflux (distillation) apparatus in a 1 liter balloon and a 40 cm spiral arm. Microemulsion structure was prepared by emulsifiers from the extract. Afterwards, 1, 8.4, and 2 mg/L dilutions of the aqueous extracts of *Hypericum perforatum* and *Aloe vera* were prepared, and the antimicrobial properties of these extracts were evaluated by disc diffusion, pour plate, and extraction methods on pure culture of *Brucella* isolated from patients.

**Results:** Evaluation of antimicrobial effects on the isolated *Brucella* strains showed that the mean diameters of the zones of inhibition in the studied strains for the of 8-1 mg/l concentrations of *Hypericum perforatum* extract were 36.6±2 and 18±3 mm, respectively, and for *Aloe vera* they were respectively 30.7±3 and 18±1 mm. None of the strains formed an inhibition zone at the 0.5 mg/l concentration. Evaluation of the effect of the extract in the well diffusion method also yielded similar results, but in the pour plate method, the effect of the extract on the bacteria was not observed. Microemulsion of the *Hypericum perforatum* extract did not have any effect because of over dilution.

**Conclusion:** The disk diffusion method under biosafety level 2 laboratory was highly effective, and the extract of *Hypericum perforatum* had the highest effect on *Brucella*; therefore, it is recommended for clinical studies.

**Keywords:** *Aloe vera*, *Brucella*, Brucellosis, *Hypericum perforatum*, Microemulsion

## مقایسه اثر عصاره گل راعی و میکروامولسیون آن با عصاره آلوئه ورا بر باکتری بروسلا

مهسا طبیب‌نژاد<sup>۱</sup>، محمد ارجمندزادگان<sup>۲</sup>، محمد یوسف علیخانی<sup>۳</sup>، مریم صدرنیا<sup>۴\*</sup>، قاسم حبیبی<sup>۵</sup>، زهرا ناصری<sup>۶</sup>

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد میکروپزشناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار میکروپزشناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

<sup>۳</sup> استاد میکروپزشناسی، مرکز تحقیقات بروسلا، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

<sup>۴</sup> استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران

<sup>۵</sup> دانشجوی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

<sup>۶</sup> کارشناسی ارشد میکروپزشناسی، مرکز تحقیقات انتقال خون، انستیتو آموزش و تحقیقات انتقال خون، همدان، ایران

\* نویسنده مسئول: مریم صدرنیا، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران.

ایمیل: msadrnia@yahoo.com

### چکیده

**سابقه و هدف:** امروزه به دلیل بروز مقاومت‌های دارویی و توانایی باکتری‌ها در ایجاد عفونت‌های حاد، استفاده از گیاهان به‌منظور بررسی اثرات ضد میکروبی آن‌ها مطرح شده است. در این راستا، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر عصاره و میکروامولسیون تهیه‌شده از عصاره گل راعی (*Hypericum perforatum*) و آلوئه ورا (*Aloe vera*) بر باکتری بروسلا صورت گرفت.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه تجربی با کمک هود در آزمایشگاه سطح ۲ انجام شد. بدین‌منظور، تعداد ۵۰ نمونه خون سرولوژی مثبت از نظر تب مالت در دستگاه BACTEC کشت داده شد و در صورت رشد، به محیط کشت بروسلا آگار در جار با اتمسفر حاوی ۱۰-۵ درصد CO<sub>2</sub> به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت منتقل گردید. در ادامه، آزمایش‌های تأییدی بیوشیمیایی روی نمونه‌های رشدیافته اجرا شد. عصاره‌گیری به‌وسیله دستگاه رفلکس (تقطیر) با حجم بالن ۱ لیتری و مبرد ۴۰ سانتی‌متری ماریپچ صورت گرفت. ساختار میکروامولسیون با کمک امولسیفایرها از عصاره ساخته شد. سپس، از عصاره‌های آبی گل راعی و آلوئه ورا، رقت‌های ۱، ۲، ۴ و ۸ میلی‌گرم بر لیتر تهیه گردید و خواص ضد میکروبی این عصاره‌ها با روش دیسک دیفیوژن، پورپلیت و انتشار چاهک روی کشت خالص بروسلاهای جداشده از بیماران مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** ارزیابی خواص ضد میکروبی بر سویه‌های بروسلاهای جداشده نشان داد که میانگین قطر هاله عدم رشد در سویه‌های مورد مطالعه برای غلظت ۸ تا ۱ میلی‌گرم بر لیتر عصاره گل راعی به ترتیب برابر با ۳۶/۶±۲ و ۱۸±۳ میلی‌متر و برای آلوئه ورا ۳۰/۷±۳ و ۱۸±۱ میلی‌متر بود و هیچ کدام از سویه‌ها در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تشکیل هاله ندادند. بررسی اثر عصاره به روش انتشار چاهکی نیز نتایج مشابهی داشت؛ اما در روش پورپلیت، تأثیر عصاره‌ها بر باکتری مشاهده نشد. شایان ذکر است که میکروامولسیون عصاره گل راعی به دلیل رقت زیاد بر سویه‌ها اثری نداشت.

**نتیجه‌گیری:** روش دیسک دیفیوژن زیر هود کلاس ۲، بهترین روش بوده و عصاره گل راعی، بیشترین تأثیر را بر بروسلا داشته است و برای مطالعات بالینی پیشنهاد می‌شود.

**واژگان کلیدی:** آلوئه ورا، بروسلا، تب مالت، گل راعی، میکروامولسیون

### مقدمه

نئوتوما (*neotomae*) تقسیم‌بندی شده است [۲]. در میان گونه‌های بروسلا، چهار گونه بروسلائی ملی‌تنسیس، بروسلائی آبورئوس، بروسلائی سوئیس و بروسلائی کنیس مهم‌ترین عامل ایجاد بیماری در انسان هستند [۳]. بروسلا در تمام نقاط دنیا وجود دارد و از مشکلات بهداشتی

بروسلا (*Brucella*)، باکتری کوکوباسیل گرم منفی بدون اسپور بی حرکت و داخل سلولی اختیاری است [۱، ۲] که عامل بروسلازیس در انسان و بسیاری از حیوانات می‌باشد. جنس بروسلا به شش گونه ملی‌تنسیس (*melitensis*)، آبورئوس (*abortus*)، سوئیس (*suvis*)، اویس (*ovis*)، کانیس (*canis*) و

گیاه دارویی به‌ویژه برای درمان افسردگی ملایم تا متوسط به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است. ترکیبات شیمیایی این گیاه عبارت است از: پسودوهیپرسیسین، پیش‌ماده‌های پروتوهیپرسیسین و پروتوپسودوهیپرسیسین، ترکیب نادر سیکلوسودوهیپرسیسین، فلاونوئیدهایی نظیر کامپفرول، کوئرستین، هیپروزید، ایزو کوئرستین، روتین، آنتوفلاون، کاتیشن‌ها، بی‌فلاونوئیدها، ادھیپرفورین، تانن‌ها، کافئیک، کلروژنیک و روغن‌های فرار مانند ژرانیول، میرسن، لیمونن، هیومیولن، کاریوفیلن، میریستیک، پالمیتیک، استتاریک، کارنوئیدها، کولین و نیکوتین آمید [۱۴]. افزون‌براین، اسانس و عصاره این گیاه علاوه بر درمان افسردگی، دارای فعالیت ضدویروسی و خاصیت معالجه زخم و آنتی‌باکتریالی می‌باشد [۱۵].

در مجموع هدف از مطالعه حاضر، تعیین اثر عصاره گیاه گل راعی و میکرومولسیون آن در مقایسه با عصاره آلونه ورا (*Aloe vera*) بر باکتری مولد تب مالت در شرایط برون تنی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### جداسازی باکتری

در این مطالعه که به‌صورت تجربی و آزمایشگاهی انجام شد، نمونه خون از افرادی که با توجه به علائم بالینی و آزمایش‌های سرولوژیک به‌عنوان بیمار بستری یا تحت درمان شناخته شدند، تهیه گردید. تهیه نمونه‌ها و تأیید آن‌ها در بخش عفونی بیمارستان فرش‌چیان همدان صورت گرفت و آزمایش‌های میکروب‌شناسی در گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان انجام شد. در مجموع، ۵۰ فرد مشکوک به بروسلا با آزمایش‌های سرولوژیک مثبت و علائم بالینی مورد مطالعه قرار گرفتند. لازم به ذکر است که این مطالعه در یک دوره ۱ ساله از اوایل سال ۱۳۹۲ تا اوایل سال ۱۳۹۳ انجام شد.

جهت انجام مطالعه، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر خون از افراد مشکوک به بیماری بروسلا تهیه شد که ۷ میلی‌لیتر از آن‌ها برای کشت در محیط‌های BACTEC استفاده شد. ویال‌های BACTEC به مدت یک هفته در دستگاه نگهداری گردیدند و موارد مثبت به محیط‌های کشت بروسلا آگار (*Brucella agar*) منتقل شدند. محیط‌ها به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در جار اتمسفر حاوی ۱۰-۵ درصد CO<sub>2</sub> و انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. ذکر این نکته ضرورت دارد که تمام محیط‌های کشت خون که توسط دستگاه BACTEC منفی اعلام می‌شد، از دستگاه خارج شده و به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل می‌گردید و به مدت ۳ هفته دیگر در انکوباتور حفظ می‌شد و در پایان هر هفته، Subculture از این محیط‌ها روی محیط‌های بلاد آگار (Blood agar) و بروسلا آگار صورت می‌گرفت. شایان توجه است که موارد منفی به مدت ۱۴ روز در دستگاه نگهداری [۸] و پس از شناسایی در رنگ‌آمیزی گرم، به‌وسیله آزمایش‌های اکسیداز، اوره‌آز، کاتالاز و تولید گاز H<sub>2</sub>S تعیین هویت شدند.

در بسیاری از کشورها محسوب می‌شود. این بیماری در بسیاری از نقاط جهان، آندمیک بوده و در کشورهای در حال توسعه از شیوع بالایی برخوردار است [۶-۴، ۲].

سازمان جهانی بهداشت (WHO: World Health Organization) تعداد موارد جدید بیماری بروسلا در هر سال را ۵۰۰ هزار مورد گزارش نموده است که این مقدار بسیار کمتر از میزان واقعی محاسبه‌شده بروز بروسلا انسانی می‌باشد [۸، ۷]. بروسلا یک بیماری با تظاهرات گوناگون است که تمام بافت‌ها و اندام‌های انسان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. علائم بالینی این بیماری به‌شدت غیراختصاصی بوده و تظاهرات بسیار متغیری را نشان می‌دهد؛ به‌طوری که به‌صورت یک سندرم تب‌دار همراه با علائم سیستمیک شامل: لرز، تعریق، سردرد، کمردرد، بی‌اشتهایی و کاهش وزن و یا به شکل بیماری‌هایی مانند: آرتریت، اسپوندیلیت، آندوکاردیت، مننژیت و غیره بروز می‌کند [۴، ۲]. درمان بروسلا با آنتی‌بیوتیک‌های رایج باعث کاهش درد و علائم بیماری و نیز کاهش عود مجدد و سایر عوارض ثانویه آن می‌شود؛ اما به‌دلیل حضور باکتری در داخل سلول‌های میزبان، استفاده از دارویی که قدرت نفوذ به درون سلول را داشته باشد، ضروری به‌نظر می‌رسد. سازمان بهداشت جهانی در سال ۱۹۸۶، رژیم دارویی داکسی‌سایکلین با ریفامپین یا استرپتومایسین را به مدت شش هفته به‌عنوان رژیم درمانی بروسلا پیشنهاد نمود؛ اما هرکدام از این رژیم‌های درمانی دارای مضراتی می‌باشند؛ از جمله بروز عودهای مجدد و سمیت به‌ویژه در کودکان و زنان باردار. علاوه‌براین، دوره طولانی درمان نیز برای بسیاری از بیماران قابل تحمل نمی‌باشد و ممکن است مقاومت دارویی ایجاد نمایند [۱۰، ۹].

امروزه به‌دلیل بروز مقاومت‌های دارویی و توانایی باکتری‌ها در ایجاد عفونت‌های حاد، استفاده از گیاهان به‌منظور بررسی اثرات ضد میکروبی آن‌ها مطرح شده است. مطالعات متعدد اثبات کرده‌اند که بسیاری از گیاهان از توانایی بالایی علیه پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی انسانی برخوردار می‌باشند. در این راستا در بسیاری از کشورهای در حال توسعه، روش‌های درمانی سنتی متکی بر گیاهان هنوز اعتبار دارد و طبق برآورد سازمان بهداشت جهانی، بیش از ۸۰ درصد از مردم دنیا از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند [۱۱].

شایان ذکر است که حدود نیمی تا یک‌سوم از محصولات دارویی عرضه‌شده در آمریکا منشأ گیاهی دارند [۱۲]. در طب سنتی از برخی گیاهان به‌عنوان گیاهان دارای خواص ضد میکروبی نام برده شده که از این گیاهان در موارد ابتلا به تب مالت استفاده شده است. هم‌اکنون نیز برخی از این گیاهان در بین عشایر و مردم بومی برخی از نقاط ایران مانند استان چهارمحال و بختیاری، کهکلیویه و بویراحمد و ایلام برای درمان تب مالت استفاده می‌گردد [۱۳].

گل راعی با نام علمی *Hypericum perforatum* یک گیاه علفی از خانواده Hypericaceae است که بومی غرب اروپا، آسیا و شمال آفریقا می‌باشد. کاربرد این گیاه در چند سال اخیر به‌عنوان

**تهیه گیاه**

معادل رقت نیم مک‌فارلند کشت چمنی گسترده انجام شد. سپس، دیسک‌های بلانک روی آگار قرار داده شد و روی هر دیسک، ۲۰ میکرولیتر از هرکدام از غلظت‌های عصاره و میکرومولسیون با کمک سمپلر ریخته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد از پشت پلیت با خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری گردید.

**روش پورلیت**

مقدار ۰/۵ سی‌سی از هرکدام از رقت‌های عصاره و میکرومولسیون به پلیت افزوده شد و ۵ سی‌سی محیط کشت به آن اضافه گردید. سپس، پتری‌دیش‌ها به‌صورت پروانه‌ای حرکت داده شد تا عصاره به‌طور یکنواخت با محیط کشت مخلوط گردد. پس از انعقاد محیط کشت، تلقیح میکروب با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند و با استفاده از سوپا انجام شد.

**روش انتشار چاهک**

چاهک‌هایی با قطر ۵ میلی‌متر روی محیط بروسلا آگار ایجاد شد و پس از کشت باکتری از سوسپانسیون ۰/۵ مک‌فارلند توسط سوپا استریل، در هر چاهک حدود ۸۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره تلقیح گردید. سپس، پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و در پایان، هاله‌های عدم رشد باکتری‌ها توسط خط‌کش اندازه‌گیری گردید. در نهایت در نمونه شاهد، میکروب روی محیط کشت بروسلا آگار فاقد چاهک و عصاره کشت داده شد.

**یافته‌ها****سویه‌های کلینیکی**

کشت خون در مورد ۵۰ فرد مشکوک به بروسلاز که از نظر آزمایش‌های سرولوژیک مثبت بودند، انجام شد و ۳۹ نمونه کشت خون که به لحاظ رشد باکتری در دستگاه BACTEC مثبت بودند، روی بروسلا آگار برده شدند.

کلنی‌های بروسلا ملی‌تنسیس پس از ۴۸ ساعت به‌صورت کلنی کوچک، صاف و بدون همولیز روی محیط بلاد آگار و کلنی‌های کوچک و صاف روی محیط بروسلا آگار رشد یافتند [۱۷، ۱۸].

برمبنای نتایج، تمام نمونه‌های خون کشت‌شده روی محیط کشت بروسلا آگار کوکوباسیل گرم منفی بودند؛ اما از نظر آزمایش‌های اوره‌آز، کاتالاز و اکسیداز، مثبت بودند. از سوی دیگر، تمام ویال‌های منفی به مدت ۳ هفته نگهداری شد و کشت مجدد صورت گرفت که نتیجه تمامی آن‌ها منفی بود.

**نتایج دیسک دیفیوژن**

نتایج نشان داد که حداکثر و حداقل هاله عدم رشد برای غلظت ۸ میلی‌گرم بر لیتر عصاره گل راعی به‌ترتیب برابر ۴۰ و ۳۱ میلی‌متر در باکتری بروسلا می‌باشد؛ به‌طوری که در نمونه

دو گیاه گل راعی و آلوئه ورا به‌صورت تازه از مزرعه گیاهان دارویی در شرق استان اصفهان تهیه شد و پس از چند مرتبه شستشو با آب به روش سنتی، در محلی به دور از نور خورشید و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ( $\pm 4$ ) طی چند روز خشک گردید. پس از آن گیاهان خشک‌شده با استفاده از دستگاه خردکننده، آسیاب شدند.

**تهیه عصاره از آلوئه ورا و گل راعی**

عصاره آبی آلوئه ورا از برگ‌های گیاه و عصاره آبی گل راعی از کل بخش‌های آن با کمک فلاسک و مبرد ۴۰ سانتی‌متری به روش رفلکس تهیه گردید.

برای شروع عصاره‌گیری، مقدار مشخصی از گیاه گل راعی خشک و آسیاب‌شده در بالن ریخته شد و با آب مقطر در حجمی معادل ۲/۵ برابر گیاه خشک، مخلوط گردید. در ادامه، حرارت‌دادن به مدت ۶ ساعت در بن‌ماری در دمای جوش انجام شد؛ بدین‌ترتیب، عصاره گیاهی از تمامی اندام‌های گیاه گل راعی به‌دست آمد. برای صاف‌کردن عصاره‌ها و جداسازی مواد معلق ناخالص نیز از سانتریفیوژ استفاده گردید [۱۶].

همچنین به‌منظور تهیه عصاره آبی گیاه آلوئه ورا، مقدار ۱۰۰ گرم از ژل گیاه در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد رفلکس شد و ترکیب حاصل‌شده در بالن تقطیر پس از سرد کردن، صاف شده و به‌عنوان عصاره گیاهی مورد استفاده قرار گرفت.

**تولید میکرومولسیون از عصاره گل راعی**

ساختار میکرومولسیونی به‌دلیل توانایی آن در بالابردن اثر ضد میکروبی، انتخاب خوبی برای وارد کردن مؤثر عصاره در سلول است. در این روش با افزودن دو نوع امولسیفایر به عصاره آبی گل راعی و قراردادن روی استیرر، عصاره در درون نانومیسل به دام افتاد. شایان ذکر است که ساختار میسل متشکل از فسفولیپید بوده و به‌صورت کروی به قطر تقریبی ۵ تا ۱۰ نانومتر می‌باشد.

**تهیه رقت از عصاره‌ها**

از عصاره‌های تهیه‌شده از گیاهان آلوئه ورا و گل راعی با استفاده از آب مقطر استریل، غلظت‌های ۸ میلی‌گرم بر لیتر، ۴ میلی‌گرم بر لیتر، ۲ میلی‌گرم بر لیتر، ۱ میلی‌گرم بر لیتر و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تهیه گردید. میکرومولسیون نیز در غلظت‌های کاهشی از ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر تهیه شد.

**روش دیسک دیفیوژن**

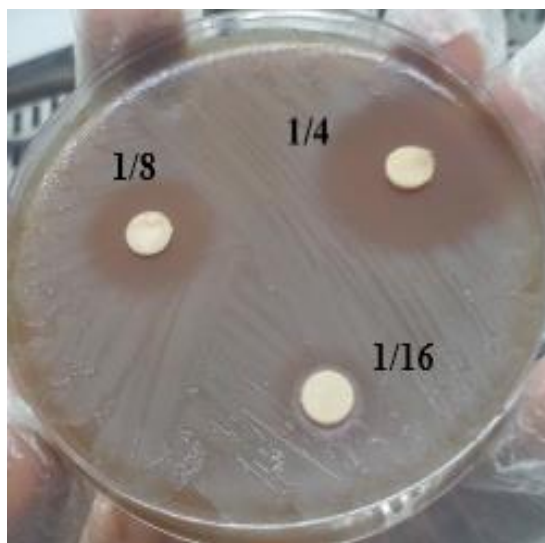
روی محیط کشت مولر هینتون آگار (Mueller hinton agar) و نیز بروسلا آگار کشت تازه سویه کلینیکی در غلظت  $1/5 \times 10^8$

شماره ۱، بیشترین و کمترین قطر هاله به ترتیب ۴۰ و ۱۸ میلی‌متر، نمونه شماره ۲، ۳۱ و ۲۰ میلی‌متر، نمونه شماره ۳، ۳۸ و ۲۰ میلی‌متر، نمونه شماره ۴، ۳۸ و ۱۶ میلی‌متر و نمونه شماره ۵، ۳۶ و ۱۶ میلی‌متر نشان داده شد. علاوه بر این، تمامی نمونه‌ها نسبت به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر مقاوم بوده و رشد نمودند (جدول ۱ و شکل ۱).

شماره ۱، بیشترین و کمترین قطر هاله به ترتیب ۴۰ و ۱۸ میلی‌متر، نمونه شماره ۲، ۳۱ و ۲۰ میلی‌متر، نمونه شماره ۳، ۳۸ و ۲۰ میلی‌متر، نمونه شماره ۴، ۳۸ و ۱۶ میلی‌متر و نمونه شماره ۵، ۳۶ و ۱۶ میلی‌متر نشان داده شد. علاوه بر این، تمامی نمونه‌ها نسبت به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر مقاوم بوده و رشد نمودند (جدول ۱ و شکل ۱).

جدول ۱: نتایج قطر هاله حاصل از تأثیر رقت‌های مختلف عصاره گل راعی (میلی‌گرم بر لیتر) در روش دیسک دیفیوژن بر حسب میلی‌متر

شماره نمونه	رقت عصاره			
	۰/۵	۱	۲	۴
۱	عدم وجود هاله	۱۸	۲۵	۳۷
۲	عدم وجود هاله	۲۰	۲۵	۲۵
۳	عدم وجود هاله	۲۰	۲۵	۳۳
۴	عدم وجود هاله	۱۶	۲۸	۳۴
۵	عدم وجود هاله	۱۶	۲۶	۲۹



شکل ۱: اثر عصاره گل راعی در روش دیسک دیفیوژن در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر بر نمونه شماره ۲ بروسلا

میلی‌گرم بر لیتر برای نمونه شماره ۳ به اندازه ۱۷ میلی‌متر است (جدول ۲ و شکل ۲).

#### نتایج پورپلیت

پس از کشت باکتری روی محیط کشت حاوی رقت‌های مختلف عصاره‌های هر دو گیاه، تمامی باکتری‌ها در ۵ رقت مختلف رشد کردند و نسبت به عصاره مقاوم بودند. نتایج به دست آمده نشان داد که روش پورپلیت، روش مناسبی جهت بررسی اثر

#### نتایج انتشار چاهکی

در جدول ۲، قطر هاله‌های عدم رشد برای ۵ سویه بروسلا ارائه شده است. با توجه به این جدول مشخص می‌شود که بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به رقت ۸ میلی‌گرم بر لیتر در هر ۵ نمونه بوده و کمترین قطر هاله عدم رشد از آن رقت ۱ میلی‌گرم بر لیتر در هر ۵ نمونه می‌باشد. علاوه بر این، بالاترین قطر هاله عدم رشد در رقت ۸ میلی‌گرم بر لیتر برای نمونه شماره ۱ برابر با ۴۰ میلی‌متر و کمترین قطر هاله عدم رشد در رقت ۱

جدول ۲: نتایج حاصل از بررسی تأثیر رقت‌های مختلف عصاره گل راعی (میلی‌گرم بر لیتر) به روش انتشار چاهکی بر حسب میلی‌متر

شماره نمونه	رقت عصاره			
	۰/۵	۱	۲	۴
۱	عدم وجود هاله	۲۱	۲۸	۳۵
۲	عدم وجود هاله	۲۰	۲۳	۲۸
۳	عدم وجود هاله	۱۷	۲۵	۳۲
۴	عدم وجود هاله	۱۸	۲۸	۳۴
۵	عدم وجود هاله	۱۸	۲۶	۲۹



شکل ۲: اثر عصاره گل راعی در روش چاهک در غلظت ۸ میلی‌گرم بر لیتر بر نمونه شماره ۲ بروسلا

عصاره نمی‌باشد.

### نتایج دیسک دیفیوژن

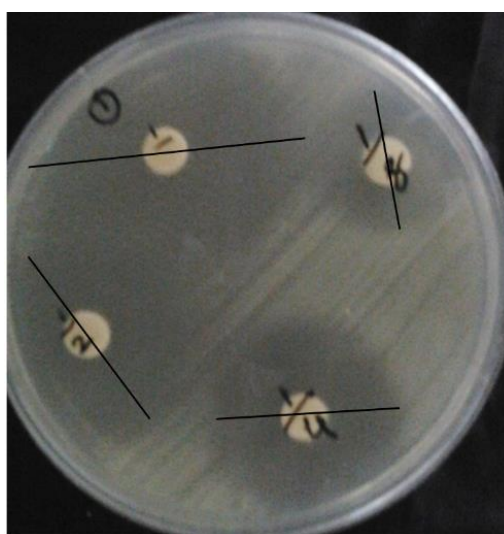
حداکثر هاله عدم رشد برای عصاره آلوئه ورا در غلظت ۸ میلی‌گرم بر لیتر برابر با ۳۳ میلی‌متر در نمونه‌های شماره ۲ و ۳ و حداقل هاله عدم رشد در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر برابر با ۱۲ میلی‌متر در نمونه شماره ۴ از سویه‌های بروسلا بود؛ برای نمونه شماره ۱، بیشترین و کمترین قطر هاله به ترتیب ۳۲ و ۲۰ میلی‌متر؛ نمونه‌های شماره ۲ و ۳، ۳۳ و ۲۰ میلی‌متر و نمونه شماره ۴، ۲۵ و ۱۲ میلی‌متر به دست آمد (جدول ۳ و شکل ۳).

### نتایج بررسی اثر میکروامولسیون تولیدشده از عصاره گل راعی

تمامی نمونه‌ها در رقت‌های مختلف عصاره به‌طور کامل رشد نمودند و هیچ‌گونه هاله‌ای را تشکیل ندادند؛ بنابراین به‌نظر می‌رسد که میکروامولسیون بسیار رقیق‌شده عصاره گل راعی، فعالیت ضد میکروبی بر سویه‌های بروسلا ندارد.

جدول ۳: نتایج حاصل از بررسی اثر رقت‌های مختلف عصاره آلوئه ورا (میلی‌گرم بر لیتر) به روش دیسک دیفیوژن بر حسب میلی‌متر

شماره نمونه	رقت عصاره			
	۱	۲	۴	۸
۱	۲۰	۲۵	۲۸	۳۲
۲	۲۰	۲۵	۲۷	۳۳
۳	۲۰	۲۵	۳۰	۳۳
۴	۱۲	۱۸	۲۳	۲۵



شکل ۳: اثر عصاره آلوئه ورا در غلظت‌های ۴، ۸، ۲ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر نمونه شماره ۱ بروسلا (غلظت ۱: ۲۵؛ غلظت ۲: ۱۵؛ غلظت ۳: ۱۲؛ غلظت ۴: ۱۰ میلی‌متر)



و از رشد باکتری ممانعت کرده است [۱۹]. باید عنوان نمود که یافته‌های این مطالعه با نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر مطابقت داشت.

عنایت‌زاده میمندی و همکاران نیز در مطالعه‌ای نشان دادند که عصاره به‌دست آمده از اندام هوایی این گیاه، هیچ اثری بر کاهش روند رشد باکتری بروسلا/آبورتوس نداشته است و نمی‌توان از آن در موارد ابتلا به تب مالت استفاده نمود [۲۰].

افزون‌براین، در مطالعه‌ای که اشراقی و همکاران به‌منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی گیاه گل راعی بر سوش‌های بیماری‌زای نوکاردیا (*Nocardia*) انجام داد، گزارش شد که عصاره متانولی این گیاه با استفاده از روش انتشار در آگار، تأثیر ضد میکروبی قابل توجهی بر جلوگیری از رشد نوکاردیا/استروئیدس (*Nocardia asteroides*) و نوکاردیا برازیلینسس (*Nocardia brasiliensis*) دارد [۲۱].

برخی از گونه‌های گل راعی در طب سنتی به‌عنوان داروی ضدآفسردگی، ضددرد، ضدکرم، مدر، ضدعفونی‌کننده، التیام‌بخش و ترمیم‌کننده زخم و غیره به‌کار می‌رفته است. بر مبنای مطالعات، ترکیبات مختلفی از این گونه گزارش شده است که فعالیت‌های زیستی خاصی را به آن نسبت می‌دهند؛ مانند: هایپرپیرین، سودوهایپرپیرین و فلاونوئیدهای مختلف همچون کوئرستین، هایپرین، فلورگلوکوسینول و اسانس که اثرات مختلف ضدآفسردگی، ضد میکروبی و فعالیت ضدالتهابی از آن‌ها گزارش شده است [۱۵].

نتایج بررسی ضدباکتریایی در مطالعه حاضر نشان‌دهنده تأثیر قابل توجه عصاره آبی گل راعی بر سوش‌های بیماری‌زای بروسلا بود. باید عنوان نمود که اگرچه باکتری‌های به‌کار گرفته شده در مطالعه حاضر با سایر مطالعات تفاوت دارد؛ اما اثر مهارکنندگی عصاره گل راعی بر آن‌ها مشابه با مطالعات ذکر شده می‌باشد.

از سوی دیگر، در مطالعات مختلف ترکیبات گوناگون این گیاه که فعالیت‌های زیستی خاصی دارند، مورد بررسی قرار گرفته و اثرات مختلف ضدآفسردگی، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدالتهابی و ضدسرطانی برای آن‌ها گزارش شده است [۲۲-۲۴].

در این راستا، نتایج مطالعه‌ای مشخص کرد که اقوام بومی استان چهارمحال و بختیاری برای درمان بیماری تب مالت از جوشانده گیاه چز کوهی استفاده می‌کنند. در بررسی جعفری کوخدان (۱۳۸۴) نیز گزارش شد که مردم بومی استان کهگیلویه و بویراحمد برای درمان بیماری تب مالت از ریشه زرشک کوهی (*Berberis vulgaris*) استفاده می‌کنند [۲۵].

همچنین، در مطالعه دیگری به بررسی اثر عصاره کلروفومی سیر (*Allium sativum*) از تیره سوسن بر مورفولوژی و فیزیولوژی بروسلا پرداخته شد. طی این مطالعه مشخص گردید که آلیستین (ماده مؤثر موجود در پیازچه سیر که مهم‌ترین ماده

در این مطالعه اثرات سه ماده عصاره گل راعی، میکروامولسیون عصاره آن و عصاره آلوئه ورا بر سویه‌های بیماری‌زای بروسلا جداسده از بیماران مبتلا به تب مالت به سه روش دیسک دیفیوژن، پورپلیت و انتشار چاهک بررسی گردید.

با توجه به نتایج به‌دست آمده مشاهده شد که میکروامولسیون عصاره گل راعی، اثر مهاری بر رشد سویه‌های بروسلا ندارد. نکته قابل توجه این است که غلظت عصاره در ساختار میکروامولسیون، یک‌هشتادم عصاره معمولی است. به‌نظر می‌رسد که عدم اثر ضدباکتریایی میکروامولسیون می‌تواند با رقت بالای عصاره در آن و نیز غلظت پایین مواد مؤثر مرتبط باشد.

در روش دیسک دیفیوژن، نتایج متفاوتی از نظر هاله عدم رشد در عصاره‌های گل راعی و آلوئه ورا به‌دست آمد و تمامی سویه‌ها (به‌جز سویه شماره ۲) حساسیت بیشتری را نسبت به رقت‌های مختلف عصاره گل راعی در مقایسه با همین رقت‌ها از عصاره آلوئه ورا نشان دادند که در این میان، سویه شماره ۱ در مقایسه با سویه‌های دیگر دارای بیشترین حساسیت نسبت به رقت‌های مختلف عصاره گل راعی بود.

از سوی دیگر، نتایج نشان می‌دهند که در روش دیسک دیفیوژن برای عصاره آلوئه ورا و در هر دو روش دیسک دیفیوژن و انتشار چاهکی برای عصاره گل راعی، با افزایش غلظت عصاره در تمامی سویه‌ها، قطر هاله افزایش یافت؛ به‌طوری که بیشترین قطر در غلظت ۸ میلی‌گرم بر لیتر عصاره (بیشترین غلظت مورد آزمایش) و کمترین قطر هاله در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر عصاره (کمترین غلظت مورد آزمایش) مشاهده شد که این امر نشان‌دهنده ارتباط مستقیم بین غلظت عصاره و اثر ضدباکتریایی آن است.

علاوه‌براین، در مطالعه حاضر عصاره گیاه گل راعی با روش انتشار چاهک مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن مشابه با یافته‌های حاصل از روش دیسک دیفیوژن بود.

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان استنباط کرد که امکان استفاده از گل راعی و ترکیبات مختلف آن به‌عنوان ماده ضد میکروبی در درمان بروسلا وجود دارد. لازم به ذکر است که گل راعی فعالیت ضد میکروبی وسیعی دارد؛ از این‌رو، امروزه با توجه به مشکلات عمده در درمان عفونت‌های مختلف و افزایش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و نیز داشتن قدرت درمانی در جهت درمان سایر بیماری‌ها می‌توان چنین نتیجه گرفت که گل راعی و ترکیبات آن می‌توانند برای درمان انواع مختلفی از بیماری‌ها به‌کار گرفته شوند.

در این زمینه، در مطالعه‌ای که شاپوری و همکاران به‌منظور بررسی اثر ضد میکروبی عصاره کلرفومی سیر بر بروسلا/آبورتوس و بروسلا ملی‌تنسیس به روش رقت در لوله و انتشار در آگار (روش انتشار چاهکی) انجام دادند، مشاهده شد که این عصاره با هر دو روش بر بروسلا/آبورتوس و بروسلا ملی‌تنسیس مؤثر بوده

مطالعه حاضر بروسلا به‌عنوان یک باکتری گرم منفی بیماری‌زا مورد استفاده و بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که تاکنون مطالعه مشخصی در ارتباط با تأثیر عصاره گل راعی بر بروسلا صورت نگرفته است و به‌نظر می‌رسد که مطالعه حاضر در نوع خود جدید باشد.

### نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر مشاهده شد که عصاره گل راعی و آلوئه‌ورا می‌توانند به‌عنوان ترکیبات ضدبروسلاهی مطرح باشند. با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی و تقویت‌کننده‌گی سیستم ایمنی این عصاره‌ها، آن‌ها می‌توانند به‌عنوان مکمل دارویی در درمان معمول تب مالت استفاده شوند.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از طرحی پژوهشی می‌باشد که با همکاری مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی دانشگاه علوم پزشکی اراک و مرکز تحقیقات بروسلوز دانشگاه علوم پزشکی همدان اجرا شده است. بدین‌وسیله پژوهشگران کمال تشکر و قدردانی را نسبت به کارکنان محترم هر دو مرکز ابراز می‌دارند. لازم به ذکر است که نتایج این مطالعه با منافع هیچ‌یک از نویسندگان در تعارض نمی‌باشد.

ضدعفونی‌کننده سیر است) اثر ممانعت‌کننده مؤثری بر رشد باکتری بروسلا در شرایط In-vitro داشته است. همچنین نشان داده شد که اثر سیر بر بروسلا، به شرایط دمایی مختلف وابسته نبوده و اثر کشندگی خود را در همان دو ساعت اول بر باکتری مورد نظر اعمال می‌کند [۱۹].

علاوه‌براین، طی مطالعه‌ای که در ارتباط با تأثیر چند گیاه دارویی بومی ژاپن بر فعالیت روزانه موش‌های مبتلا به سندرم خستگی مزمن ناشی از تلقیح بروسلا/بورتوس انجام شد، مشخص گردید که هوکو ایکی تو می‌تواند اثر مهارکننده مؤثری بر کاهش فعالیت روزانه داشته باشد [۲۶].

ذکر این نکته ضرورت دارد که مطالعات بسیاری در ارتباط با اثرات ضد میکروبی عصاره گونه‌های مختلف گل راعی در داخل و خارج از کشور صورت گرفته است. در مطالعات انجام‌شده در کشور ایران، بیشتر به بررسی اثرات ضدافسردگی، ضدالتهای، ضدسردرد، ضد میگرنی و ضد تشنجی گل راعی پرداخته شده و در پاره‌ای از مطالعات صورت‌گرفته در خارج از کشور نیز آثار ضد ویروسی آن به‌ویژه علیه ویروس ایدز مدنظر قرار گرفته است [۲۷-۲۹].

با توجه به اینکه مطالعات انجام‌شده در داخل و خارج از کشور بر آثار متعدد گیاه گل راعی از جمله اثرات ضد میکروبی آن (به‌ویژه بر میکروارگانیسم‌های گرم مثبت) متمرکز بوده است، طی

## REFERENCES

- Hosseini-Doust SR, Ahmadi A, Ahmadi Z, Hajia M, Safiri Z, Golmanesh L. Detection of brucella abortus by PCR assay and comparison with culture assay. *J Mil Med*. 2005;7(3):239-44. [Persian]
- Pishva A, Salehi M, Ebrahimi M, Salehi R. Identification of brucella spp in central region of Iran. *Iran J Biol*. 2007;20(1):15-21. [Persian]
- Zhouqi A, Samar G. Interpretation of brucellosis quick experiments. *J Nabz*. 1996;6:26-30. [Persian]
- Haji Khani B, Sepehri Serasht S. Senior Microbiology. Tehran: Ibn Sina University Jihad; 2010.
- Al-Eissa YA. Brucellosis in Saudi Arabia: past, present and future. *Ann Saudi Med*. 1999;19(5):403-5. PMID: 17277503
- Bailey W, Scott EG. Diagnostic microbiology. 10<sup>th</sup> ed. New York: Elsevier Health Sciences; 1998.
- Rezazadeh M, Hajilooi M, Rafiei A, Haidari M, Nikoopour E, Keramat F, et al. TLR4 polymorphism in Iranian patients with brucellosis. *J Infect*. 2006;53(3):206-10. Doi: 10.1016/j.jinf.2005.10.018
- Maleknejad P, Peeri-Dogaheh H, AmirZargar AA, Jafari S, Fatollahzadeh B. Diagnosis of brucellosis by use of BACTEC blood culture and confirmation by PCR. *J Vet Res*. 2007;62(4):83-6.
- Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Garcia-Ordóñez MA, Cardenas A, Colmenero JD. Development and evaluation of a PCR-enzym-linked immunosorbent assay for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol*. 2003;41(1):144-8. PMID: 12517839
- Martínez de Tejada G, Pizarro-Cerdá J, Moreno E, Moriyon I. The outer membranes of brucella spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect Immun*. 1995;63(8):3054-61. PMID: 7622230
- Serrentino J. How natural remedies work. New York: Harley and Marks Publishers; 1991. P. 20-2.
- Clark AM. Natural products as a resource for new drugs. *Pharm Res*. 1996;13(8):1133-44. PMID: 8865302
- Pirbalouti AG. Medicinal plants used in Chaharmahal and Bakhtyari districts of Iran. *Herba Polonica*. 2009;55(2): 669-75.
- Mirza M. Research of medicinal and aromatic plants. New York: Publications of Forests and Meadows; 1998. P. 1.
- Naghdi Badi H, Amin G, Makkizadeh M, Ziai SA. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review. *J Med Plants*. 2005;4(16):1-4. [Persian]
- Barnes J, Anderson A, Phillipson JD. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol*. 2001;53(5):583-600. PMID: 11370698
- Yagupsky P. Detection of Brucellosis in blood cultures. *J Clin Microbiol*. 1999;37(11):3437-42. PMID: 10523530
- Bannatyne RM, Jackson MC, Memish Z. Rapid diagnosis of Brucella bacteremia by using the BACTEC 9240 system. *J Clin Microbiol*. 1997;35(10):2673-4. PMID: 9316932
- Shapoury R, Sattari M, Mohammad Hassan Z. Study effect of garlic chloroform extract (Allicin) on physiology and morphology of brucella. *J Med Plants*. 2004;2(10):15-22. [Persian]
- Anayatzade Meimandi SA. Effect of *Teucrium* spp. And local name (Chez Kouhi) on *Brucella abortus* bacteria. [Master Thesis]. Shahrekord: Islamic Azad University, Shahrekord Branch; 2005. [Persian]
- Eshraghi S, Amin G, Othari A. Evaluation of antibacterial properties and review of 10 medicinal herbs on preventing the growth of pathogenic nocardia species. *J Med Plants*. 2009;88(32):60-78. [Persian]
- Cecchini C, Cresci A, Coman MM, Ricciutelli M, Sagratini G, Vittori S, et al. Antimicrobial activity of seven *Hypericum* entities from central Italy. *Planta Med*. 2007;73(6):564-6. PMID: 17516331 DOI: 10.1055/s-2007-967198
- Kang BY, Chung SW, Kim TS. Inhibition of interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages by hypericin, an active component of *Hypericum perforatum*. *Planta Med*. 2001;67(4):364-6. PMID: 11458458 DOI: 10.1055/s-2001-14333
- Gartner M, Muller T, Simon JC, Giannis A, Sleeman JP. Aristoforin, a novel stable derivative of hyperforin is a potent



- anticancer agent. *Chembiochem*. 2005;6(1):171-7. PMID: [15593112](#) DOI: [10.1002/cbic.200400195](#)
25. Jafari Kookhdan AS. Traditional medicine in the great Qashqai. Proceedings of the National Conference on the Sustainable Development of Medicinal Plants, Mashhad, Iran; 2005. P. 647.
26. Xing, QW, Takashi T, Zhu SJ, Moriya J, Saegusa S, Yamakawa J, et al. Effect of Hochu-ekki-to (TJ-41), a Japanese Herbal Medicine, on daily activity in murine model of chronic fatigue syndrome. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2004;1(2):203-6. PMID: [15480446](#) DOI: [10.1093/ecam/neh020](#)
27. Länger R. Die HMPC-Monographie zu Hypericum: Hintergründe, Entstehung, Inhalte. *WMW Wiener Med Wochenschrift*. 2010;160(21):557-63. DOI [10.1007/s10354-010-0846-6](#)
28. Isacchi B, Bergonzi MC, Carnevali F, van der Esch SA, Vincieri FF, Bilia AR. Analysis and stability of the constituents of St. John's wort oils prepared with different methods. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;45(5):756-61. PMID: [17920801](#) DOI: [10.1016/j.jpba.2007.08.025](#)
29. German pharmacopoeia, EB6 (Deutsches Arzneibuch. Suppl.). 6<sup>th</sup> ed. Bonn: Phytopharmaceutical Corporation; 1941. P. 409.