Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol.14, No.2, Summer 2014, Pages 127- 132

Antimicrobial Activity of Allicin against Colonizing Group B Streptococci Isolated from Pregnant Women in Ardabil, Iran

Jannati E[1], Asadollahi M[2], Peeri Doghaheh H[3], Arzanlou M[3*]

[1]Young Researchers Club, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran
[2] Ardabil Health Network, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
[3] Department of Microbiology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

* Corresponding Author: Tel: +984515512788 Fax: +984515513776 E-mail: m.arzanlou@arums.ac.ir

Received: 6 Dec 2013 Accepted: 5 May 2014

ABSTRACT

Background and Objectives: Group B streptococci (GBS) are the major cause of neonatal and maternal infections. They are susceptible to penicillin, ampicillin and first-generation cephalosporins. However, resistance to other antibiotics such as erythromycin and clindamycin is common among GBS strains. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of allicin against colonizing GBS strains in vitro.

Methods: Garlic extract was prepared and allicin was purified using semi-preparative HPLC procedure. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of allicin were determined for 52 GBS strains using microdilution method in Todd Hewitt broth medium.

Results: MIC of allicin was 64-128 µg/mL (MIC90 = 128) and MBC of allicin was 128 to 512µg/mL (MBC90 = 256) for GBS strains.

Conclusion: The results of this study showed that allicin can inhibit growth of GBS in vitro. Further studies on allicin might be worthy of evaluation as a therapeutic agent in treatment of GBS infections.

Keywords: Allicin; Group B Streptococcus; MBC; MIC

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-12-03]

اثر ضد میکربی آلیسین بر استرپتوکوکهای گروه B کلونیزه کننده جدا شده از زنان باردار در شهر اردبیل، ایران

*الهام جنتی[۱]، ملیحه اسدالهی[۲]، هادی پیری دوگاهه[۳]، محسن ارزنلو[۳]**

[۱] باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، اردبیل، ایران [۲] شبکه بهداشت اردبیل، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

[۳] گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

*نویسنده مسئول: تلفن: ۰۴۵۱۵۵۱۲۷۸۸ فاکس: ۰۴۵۱۵۵۱۳۷۷۶ پست الکترونیک: m.arzanlou@arums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: استرپتوکوک های گروه B (GBS) از مهم ترین علل عفونت های نوزادان و مادران می باشد. این گروه از باکتریها هنوز نسبت به پنی سیلین، آمپی سیلین و سفالوسپورین های نسل اول حساس هستند. با این وجود مقاومت در برابر دیگر آنتی بیوتیک ها مانند اریترومایسین و کلیندامایسین رایج است. این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد میکروبی آلیسین بر GBS در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.

روش کار: عصاره سیر تهیه و آلیسین با استفاده از روش HPLC نیمه کمی خالص سازی شد. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) آلیسین برای ۵۲ ایزوله GBS کلونیزه کننده جدا شده از دستگاه تناسلی در خانم های حامله به روش میکرودایلوشن در محیط کشت تاد هویت براث تعیین شد.

نتایج: MIC آلیسین برای سویه های مورد مطالعه ۶۴-۱۲۸ µg/mL (MIC۹۰=۱۲۸) و MBC آن ۱۲۸ -۵۱۲ µg/mL (MBC۹۰=۲۵۶) بود.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که آلیسین می تواند رشد GBS را در شرایط آزمایشگاهی مهار نماید. لذا با مطالعات بیشتر، احتمالاً می توان در آینده از آن برای مقابله با عفونت های ناشی از این باکتری استفاده نمود.

کلمات کلیدی: آلیسین؛ استرپتوکوک های گروه B؛ حداقل غلظت بازدارندگی؛ حداقل غلظت کشندگی

دریافت: ۹۲/۹/۱۵ **پذیرش:** ۹۳/۲/۱۵

مقدمه

استرپتوکوک‌های گروه B (GBS[1]) از عوامل مهم عفونت های شدید و کشنده در میان نوزادان شناخته می شوند. این باکتری همچنین قادر است در زنان حامله، افراد مسن و بیماران با ضعف سیستم ایمنی بیماریهای متعددی را بوجود آورد [۱]. به طور معمول حدود ۴۰-۱۰٪ خانمها GBS را در ناحیه دستگاه ادراری-تناسلی و روده خود حمل می کنند [۳،۲]. کلونیزاسیون مادر به عنوان یک فاکتور خطر مهم برای عفونت در نوزادان محسوب می شود. چرا که باکتری در شرایطی همانند پارگی زود هنگام پرده آمنیوتیک به شکل بالا رونده می تواند جنین را آلوده نماید و یا در زمان زایمان به آن منتقل شود و بیماریهای خطرناکی همانند سپسیس، پنومونی و مننژیت را ایجاد نماید [٤]. از این رو در بسیاری از کشورها مادران در هفته های ۳۵-۳۷ حاملگی جهت حاملی GBS غربالگری می شوند و در صورت مثبت بودن، پیش گیری دارویی در مورد آنها صورت می گیرد [۵]. مطالعات بسیاری نشان داده اند پیشگیری

[1] Group B Streptococci

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-12-03]

دارویی باعث کاهش وقوع بیماری اولیه در نوزادان می شود [۵]. پنی سیلین G و آمپی سیلین داروی انتخابی برای پروفیلاکسی و درمان عفونت‌های استرپتوکوکی می باشند. سفازولین در مواردی که بیمار نسبت به بتا لاکتام ها حساسیت فوری نشان نمی دهد قابل استفاده است. کلیندامایسین، اریترومایسین و ونکومایسین برای بیمارانی که به پنی سیلین حساسیت دارند توصیه می شود [۶]. تاکنون در میان استرپتوکوک های گروه B نسبت به پنی سیلین و ونکومایسین مقاومت گزارش نشده است. با این وجود در برخی از مطالعات سویه هایی با حساسیت کاهش یافته نسبت به پنی سیلین و نیز موارد زیادی از شکست درمان با استفاده از این آنتی بیوتیک گزارش شده است [۷،۳]. مقاومت به کلیندامایسین و اریترومایسین در GBS به میزانهای مختلف در سراسر جهان وجود دارد [۸،۳] در این مطالعه اثر ضد میکروبی آلیسین بر GBS در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. آلیسین ماده حاوی گوگرد است که در عصاره سیر وجود دارد و بیش از ۷۰٪ ترکیبات ارگانوسولفوره آن را تشکیل می‌دهد [۱۰،۹]. بسیاری از خواص بیولوژیک عصاره سیر را به آلیسین نسبت می دهند. محققین مختلف فعالیت های ضد میکروبی، ضد سرطانی، ضد تجمع پلاکت و آنتی اکسیدانی را برای آلیسین نشان داده اند [۱۱]. آلیسین از طریق مهار آنزیم ها و توکسین های حاوی گروه های سولفیدریل در میکروارگانیسم ها با عث مرگ و یا خلع سلاح آنها می شود [۱۳،۱۲]. بدلیل ناپایداری و گران بودن آلیسین خالص در عمده مطالعات گذشته از عصاره سیر حاوی آلیسین جهت مطالعه اثر ضد میکروبی آن استفاده شده است. در این مطالعه ما آلیسین را خالص سازی و از آن جهت مطالعه اثر ضد میکروبی در مقابل GBS استفاده کردیم.

روش کار

مواد و سویه ها

در این مطالعه محیط های کشت بلاد آگار، مولرهینتون آگار و مولر هینتون براث از شرکت مرک آلمان تهیه شد. محیط کشت تاد هویت براث از شرکت سیگما خریداری گردید. متانول و اتیل پارابن از شرکت مرک تهیه شدند.

در مجموع از ۵۲ سویه GBS استفاده شد. این سویه ها از خانمهای باردار در شهر اردبیل جدا شده بودند [۳]. سویه ها جهت استفاده روزانه در محیط بلاد آگار در دمای ٤ درجه سانتی گراد و جهت استفاده طولانی مدت در محیط تاد هویت براث به همراه ۱۵٪ گلیسرول در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. همراه این سویه ها از سویه ی استاندارد GBS (ATCC=۱۲۳۸۶) نیز استفاده شد.

تهیه عصاره سیر

عصاره سیر براساس کارهای قبلی با مختصری تغییر تهیه شد [۱۰]. به این ترتیب که سیر از یک مغازه ی محلی در شهر اردبیل تهیه شد. بعد از جداکردن فلس ها و شستشو، حبه ها توسط هاون کوبیده و له شدند، سپس توسط هموژنایزر (Heidolph Silentcrush M, Schwabach, Germany) بطور کامل هموژنیزه و در نهایت با اولتراسونیکاتور (UP200H, Hielscher Ultrasonics, Teltow, Germany) به مدت ۵ دقیقه در ظرف حاوی یخ سونیکه شد. خمیر به دست آمده از میان ۵ لایه گاز استریل عبور داده شد. به منظور جداسازی اجزای شناور به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۵۸ g و ٤ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. سوپرناتانت به دست آمده جهت حذف پروتئین ها با حجم برابر متانول مخلوط و مجدداً سانتریفیوژ گردید و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگه داری شد.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-12-03]

استخراج، تغلیظ و اندازه گیری آلیسین

استخراج آلیسین با استفاده از روش HPLC نیمه کمی انجام شد. به این ترتیب که ۰/۵ میلی لیتر از عصاره متانولی سیر (50/50 v/v) به سیستم HPLC مجهز به یک ستون نیمه کمی C18, Nucleosil 100 ODS (5µm) ، با ابعاد یک در پانزده سانتی متر (Teknokroma Barcelona Spain) تزریق شد. فاز متحرک مخلوط 50/50 v/v متانول و آب بود. کروماتوگرافی در دمای اتاق با سرعت ۲ میلی لیتر در دقیقه انجام شد. آلیسین خروجی در طول موج۲۲۰ نانومتر شناسایی شد. پیک حاوی آلیسین در لوله فالکون جمع آوری و توسط فریزدرایر تغلیظ شد.

میزان آلیسین بعد از تغلیظ با استفاده از روش HPLC آنالیتیکال مطابق کارهای قبلی نویسندگان تعیین شد [۱۰] و محلول آبی آلیسین برای استفاده های بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. در این مطالعه از آلیسین تجاری (LKT Laboratories Inc., St Paul, MN, USA) با درجه خلوص ۹۹/۳۹٪ به عنوان استاندارد استفاده شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC[۲])

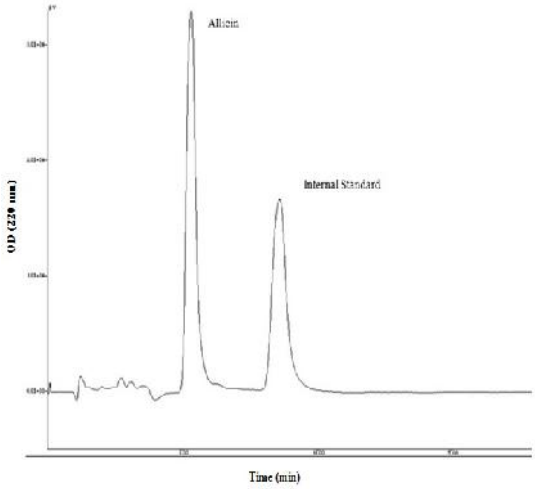
تعیین MIC آلیسین برای سویه های GBS به روش میکرودایلوشن مطابق توصیه CLSI انجام شد [۱٤]. با این تفاوت که بجای محیط مولر هینتون براث از محیط تاد هویت براث استفاده شد. سریال یک دوم رقت آلیسین در محیط کشت تاد هویت براث استریل برای محدوده غلظت‌های ٤-۵۱۲ میکروگرم در میلی لیتر آماده شد. سپس۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به داخل چاهکهای میکروپلیت منتقل شد. سوسپانسیون میکروبی با کدروت برابر استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد سپسس با استفاده از سرم فیزیولوژی رقت یک دهم از آن تهیه شد نهایتاً ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی در درون هر کدام از چاهک ها تلقیح شد. میکروپلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری شدند. غلظت مربوط به چاهکی که در آن کدورتی مشاهده نشد، به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC[۳])

برای تعیین MBC، ۱۰ میکرولیتر از محتویات چاهکهایی که در مرحله ی تعیین MIC رشد قابل مشاهده ای نداشت در محیط کشت مولرهینتون آگار حاوی ۵٪ خون گوسفند کشت داده شد. مطابق توصیه ی CLSI غلظتی که بیش از ۹۹٪ باکتری ها در آن از بین رفته بود به عنوان MBC گزارش شد [۱٤].

یافته ها

شکل ۱ کروماتوگرام آلیسین را بعد از خالص سازی نشان می دهد. سایر پیک ها حذف شده و آلیسین بیش از ۹۵٪ خالص می باشد. پیک مربوط به آلیسین در دقیقه ۶ و استاندارد داخلی (اتیل پارابن) در دقیقه ۱۰ خارج شد. از آشکارساز UV در طول موج۲۲۰ نانومتر جهت ردیابی آلیسین استفاده شد.



شکل ۱. نمونه ای از کروماتوگرام آلیسین خالص و تغلیظ شده به همراه استاندارد داخلی

[2] Minimum Inhibitory Concentration

[3] Minimum Bactericidal Concentration

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-12-03]

نتایج MIC و MBC آلیسین برای ۵۲ سویه مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده اند. MIC ۹۰ آلیسین برای سویه های مورد مطالعه برابر ۱۲۸ و MBC ۹۰ آن برابر ۲۵۶ میکروگرم در میلی لیتر بود.

جدول ۱. نتایج MIC و MBC آلیسین در ۵۲ سویه مورد مطالعه

MIC (µg/mL)	تعداد (٪)
۱۲۸	٤٤ (۸٤/۶)
۶٤	۸ (۱۵/۳)
MBC (µg/mL)	تعداد (٪)
۵۱۲	۳ (۷/۲)
۲۵۶	٤۰(۷۸.۸)
۱۲۸	۹ (۱۷/۳)

بحث

بکارگیری استراتژی پروفیلاکسی با آنتی بیوتیک برای جلوگیری از عفونت های پری ناتال زودرس ناشی از GBS، وقوع بیماری های نوزادی ناشی از این باکتری را به میزان ۷۰٪ کاهش داده است [۵]. با این وجود افزایش استفاده از آنتی بیوتیک ها جهت پروفیلاکسی موجب بالا رفتن مقاومت آنتی بیوتیکی در استرپتوکوک های گروه B شده است. آمپی سیلین و پنی سیلین به عنوان داروی انتخابی برای درمان و نیز پروفیلاکسی در مادران باردار استفاده می شوند. در صورت وجود حساسیت آنتی بیوتیکهای دیگر مانند اریترومایسین و کلیندامایسین به عنوان جایگزین استفاده می شوند [۶]. گزارش های متعددی از بروز مقاومت در برابر آنتی بیوتیکهای فوق الذکر از مناطق مختلف دنیا از جمله ایران وجود دارد [۸،۳]. این امر می تواند استفاده بالینی آنها را محدود نماید. در مواردی کاهش حساسیت یا افزایش MIC در مقابل پنی سیلین نیز گزارش شده است [۷،۳]. با گسترش سویه های مقاوم، نیاز به استراتژیهای جدید برای درمان و پروفیلاکسی عفونت های ناشی از این باکتری احساس می شود. نتایج این مطالعه نشان داد که آلیسین در برابر GBS موثر است. در این مطالعه میزان MIC آلیسین نسبت به GBS بین ۱۲۸-۶٤ میکروگرم در میلی لیتر (MIC۹۰=۱۲۸) و میزان MBC آن بین ۵۱۲-۱۲۸ (MBC۹۰= ۲۵۶) بود. در مطالعات دیگر نیز مقادیر مشابه MIC و MBC برای آلیسین در برابر باکتریهای مختلف ذکر شده است [۱٤]. در مطالعه کوتلر و همکاران که با استفاده از عصاره آبی آلیسین بر روی ۷۶ سویه GBS انجام شد میزان MIC مابین ۹۵-۳۵ میکروگرم در میلی لیتر گزارش گردید [۱۵]. تفاوت در میزان MIC احتمالاً به روش انجام کار و نوع محیط کشت بکار رفته مربوط می شود. سیر از دیر باز در درمان عفونت های واژینال استفاده می شده است [۱۵، ۱۶] در یک مطالعه بالینی نشان داده شده است که ورقه های تازه سیر قادر بودند بشکل موثری ولوواژینیت علامت دار ناشی از GBS را درمان نمایند [۱۶].

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد آلیسین اثر ضد میکروبی قابل قبولی بر GBS دارد. میزان بالای MIC آلیسین در برابر GBS احتمالاً استفاده بالینی آن را بصورت سیستمیک محدود خواهد کرد. با این وجود استفاده از آن در قالب فرمولاسیونهای موضعی می تواند در حذف حالت ناقلی GBS در خانم های حامله مفید باشد. این بحث می تواند موضوع مطالعات آینده قرار گیرد.

این مقاله از پایان نامه دوره پزشکی عمومی خانم ملیحه اسدالهی، مصوب دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل استخراج شده است. بدین وسیله نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل که حمایت مالی این پروژه را بعهده داشتند، تشکر و قدردانی می نمایند.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-12-03]

References

1- Edwards MS, Baker CJ. Group B streptococcal infections in elderly adults. Clin Infect Dis. 2005 Sep; 41(6): 839-847.

2- Picard FJ, Bergeron MG. Laboratory detection of group B streptococcus for prevention of perinatal disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004 Sep; 23(9): 665-671.

3- Jannati E, Roshani M, Arzanlou M, Habibzadeh S, Rahimi G, Shapuri R. Capsular serotype and antibiotic resistance of group B streptococci isolated from pregnant women in Ardabil, Iran. Iran J Microbiol. 2010 Sep; 4 (3): 130-135.

4- Koenig JM, Keenan WJ. Group B streptococcus and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. Pediatr Clin North Am. 2009 Jun; 56(3): 689-708.

5- Schrag SJ, Zell ER, Lynfield R, Roome A, Arnold KE, Craig AS, et al. A population-based comparison of strategies to prevent early-onset group B streptococcal disease in neonates. N Engl J Med. 2002 Jul: 347 (4): 233-239.

6- Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, Schuchat A. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. MMWR Recomm Rep. 2002 Aug; 51(RR-11):1-22.

7- Kimura K, Suzuki S, Wachino J, Kurokawa H, Yamane K, Shibata N, et al. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Aug; 52 (8): 2890-2897.

8- Lee BK, Song YR, Kim MY, Yang JH, Shin JH, Seo YS, et al. Epidemiology of group B streptococcus in Korean pregnant women. Epidemiol Infect. 2010 Feb; 138 (2): 292-298.

9- Lawson LD. (1996). The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. In Koch HP and Lawson LD, editors. Garlic: the science and therapeutic application of *Allium sativum L* and related species, 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996: 37-39.

10- Arzanlou M, Bohlooli S. Introducing of green garlic plant as a new source of allicin. Food Chem. 2010 May; 120 (1): 179-183.

11- Corzo-Martinez M, Corzo N, Villamiel M. Biological properties of onions and garlic. Trends Food Sci Tech. 2007 Dec; 18(12): 609–625.

12- Arzanlou M, Bohlooli S. Inhibition of streptolysin O by allicin, an active component of garlic. J Med Microbiol. 2010 Sep; 59 (9): 1044–1049.

13- Arzanlou M, Bohlooli S, Jannati E, Mirzanejad-Asl H. Allicin from garlic neutralizes the hemolytic activity of intra- and extra-cellular pneumolysin O in vitro. Toxicon. 2011 Mar; 57(4): 540-545.

14-CLSI-Clinical Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically: M07-A8. Wayne, P.A: Clinical Laboratory Standards Institute; 2009.

15- Cutler RR, Odent M, Hajj-Ahmad H, Maharjan S, Bennett NJ, Josling PD, et al. In vitro activity of an aqueous allicin extract and a novel allicin topical gel formulation against Lancefield group B streptococci. J Antimicrob Chemother. 2009 Jan; 63(1):151-4.

16- Cohain JS. Long-term symptomatic group B streptococcal vulvovaginitis: eight cases resolved with freshly cut garlic. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2009 Sep;146 (1):110–111.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-12-03]