

بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره های مтанولی و استونی گیاهان گزنه و آویشن شیرازی بر سویه های سودوموناس آئروژینوزا تولیدکننده متالوبتالاقتاماز

مهندنه روشنی^۱، محسن حیدری^{*}، حسین گودرزی^۱، علی هاشمی^۱، گیتا اسلامی^۱، ندا یوسفی^۱

(۱) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۱۴

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۲

چیکده

مقدمه: سودوموناس آئروژینوزا از عوامل عمدۀ عفونت های بیمارستانی می باشد. یکی از راه های توسعه داروهای ضد میکروبی استفاده از گیاهان دارویی می باشد. با توجه به کاربرد گسترده گیاه گزنه و آویشن شیرازی در طب سنتی و اثرات بالقوه این گیاهان قصد داریم اثرات ضد باکتریایی عصاره های استونی و مтанولی آن ها را روی سودوموناس آئروژینوزا حاوی ژن های متالوبتالاقتاماز bla VIM و bla IMP بررسی کنیم.

مواد و روش ها: این مطالعه روی زخم ۴۴۸ بیمار دچار سوختگی انجام شد. بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن صورت گرفت. برای تشخیص متالوبتالاقتاماز از روش CDDT (ایمی پنم- ایمی پنم + EDTA) و جهت شناسایی ژن های متالوبتالاقتامازی از PCR و Sequencing استفاده شد. حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد (MIC) آنتی بیوتیک ها و عصاره ها به روش رقت در آگار تعیین و گزارش گردید.

یافته های پژوهش: ۸۳ سویه به ایمی پنم مقاوم بودند که ۴۸ سویه با روش CDDT (ایمی پنم- ایمی پنم + EDTA) دارای آنزیم متالوبتالاقتاماز تشخیص داده شدند. از این تعداد ۶ سویه حاوی ژن bla VIM بودند اما هیچ یک ژن را نداشتند. این مطالعه نشان داد که عصاره های مтанولی و استونی گزنه و آویشن شیرازی روی سویه های سودوموناس آئروژینوزا تولید کننده IMP اثر داشتند.

بحث و نتیجه گیری: شیوع سودوموناس آئروژینوزا تولیدکننده متالوبتالاقتاماز در بین بیماران بالا بوده و نیز با توجه به مقاومت بالای آنتی بیوتیکی، استفاده از گیاهان دارویی از جمله گزنه و آویشن شیرازی می تواند اثر خوبی بر روی سویه های سودوموناس آئروژینوزا داشته باشد. ولی معرفی آن به عنوان یک ترکیب ضد باکتریایی نیاز به تحقیقات وسیع تری دارد.

واژه های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آنتی بیوتیکی، گزنه، آویشن شیرازی، متالوبتالاقتاماز

*نویسنده مسئول: گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

Email: Mohsenheidary40@gmail.com

میکروارگانیسم ها و کاهش تاثیر در اثر کاربرد مداوم ایجاد شده است(۱۲). درمان به وسیله گیاهان دارویی در مقایسه با داروهای صناعی، ارزان تر و آسان تر بوده و عوارض جانبی کمتری را به همراه دارد. از طرفی تمایل مردم به مصرف داروهای گیاهی بیشتر از داروهای شیمیایی است(۱۳). از جمله این گیاهان می توان گیاه گزنه را نام برد. گزنه با نام علمی *Urtica Dioica* جزو گیاهان شاخص خانواده *Urticaceae* می باشد(۱۴). تیره گزنه شامل گیاهانی علفی چند ساله به ارتفاع ۸-۱۰ سانتی متر است. بیشتر بخش های هوایی آن پوشیده از پر زبوده و محل رویش آن شمال غرب و مرکز ایران می باشد. ترکیبات گزنه شامل ترکیبات آیدوست مانند فلاونونیدها، لکتین، پلی ساکاریدها، اسید استیک و اسید بوتیریک است(۱۵). گیاه گزنه به عنوان گیاه دارویی از زمان های بسیار دور مورد توجه قرار داشته است. به طوری که در طب سنتی ایران، گزنه به عنوان داروی کمکی در درمان دیابت معرفی شده است. هم چنین گیاه گزنه به عنوان ضد التهاب، ضد درد، کاهنده قند و فشارخون، بی حس کننده موضعی و رفع کننده التهاب پروستات به کار رفته است(۱۶). به تازگی از این گیاه در درمان بیماری های عفونی و آرتریت استفاده شده است. از دیگر کاربردهای دارویی گزنه می توان به درمان عفونت مثانه و مجرای ادراری، بزرگ شدگی پروستات، حساسیت فصلی و درمان آکنه اشاره نمود(۱۷). در کشورهای اروپایی نیز از گزنه به منظور کاهش التهاب مفاصل و درمان آرتریت روماتوئید استفاده می شود(۱۸). آویشن از قرن ۱۶ رسماً به عنوان یک گیاه دارویی معرفی شده و در تمام فارماکوپه های معتبر ثبت شده است. آویشن یا آویشم گروهی از گیاهان تیره نعناع راسته لامیل ها است که شامل ۳ جنس می باشد: ۱- زاتاریا که گونه ای از آن در جنوب ایران موجود است و به آویشن شیرازی یا پهن برگ معروف است. ۲- زیزیفورا: است جنس آویشن باریک برگ گونه ای از آن است. ۳- جنس تیموس که بسیار متعدد ۱۷ گونه از آن گزارش شده که ۱۴ گونه از آن ها متعلق به ایران است. گونه ولگاریس از این جنس به نام آویشن معمولی یا آویشن باغی است.

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا پاتوژن فرصت طلب و بسیار مهم بیمارستانی است که مقاومت بالایی به بیشتر آنتی بیوتیک ها دارد(۱،۲). به همین جهت درمان عفونت های ناشی از این باکتری همواره با مشکلات زیادی روبرو بوده است(۳،۴). سودوموناس آئروژینوزا از عوامل اصلی مرگ و میر در افراد دچار نقص سیستم ایمنی، بیماران دچار سوختگی شدید و افراد مبتلا به فیروز سیستیک می باشد(۵). هم چنین این باکتری باعث ایجاد سپتی سمی، پنومونی، اندوکاردیت و عفونت های دستگاه ادراری، پوست، گوش و چشم می گردد(۶) و به عنوان یک تهدید بسیار جدی برای بیماران بستری در بیمارستان های سراسر دنیا به شمار می آید(۷). درمان عفونت های ایجاد شده به وسیله سودوموناس آئروژینوزا در افراد دچار سوختگی های شدید بسیار مشکل است، زیرا این باکتری مقاومت بالایی به اکثر آنتی بیوتیک های رایج دارد(۷،۸). از علل اصلی این مقاومت تولید آنزیم های بتا لاکتاماز توسط این باکتری می باشد که هم کلاس A این گروه از آنزیم ها، بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs)، و هم کلاس B آن، متالوبتا لاکتاماز (MBL)، در سودوموناس آئروژینوزا یافت می شود(۸). بتالاکتامازهای وسیع الطیف به وسیله پلاسمیدها کد می شوند(۹) و باکتری ها را به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک های خانواده سفالوسپورین و مونوبتاکدام مقاوم می کنند(۱۰). هم چنین متالوبتا لاکتامزها بر روی عناصر ژنتیکی (ترانسپوزون و پلاسمیدها) وجود دارند و قادر به هیدرولیز آنتی بیوتیک های کارباپنیم و تقریباً همه عوامل دارویی بتالاکتم با طیف وسیع هستند(۱۱). استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری ها از زمان های بسیار قدیم رایج بوده است و بشر در طول سالیان دراز به اثرات مفید آذ ها پی برده و از این گیاهان در جهت درمان استفاده می کرده است. با پیشرفت های زندگی شهری و افزایش جمعیت به تدریج از مصرف گیاهان دارویی کاسته و داروهای شیمیایی جایگزین آذ ها شده اند که البته با مصرف این داروها نیز مشکلاتی از قبیل مقاومت روز افزون در

سودوموناس آئروژینوزا مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس کلیه های مشکوک از نظر رنگ، تولید پیغمان، بوی محیط کشت و لام مستقیم برای مشاهده باسیل های گرم منفی بررسی شدند. جهت تشخیص قطعی از تست های بیوشیمیایی معمول آزمایشگاهی شامل تست اکسیداز، تخمیر قد، رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد، تست حرکت و محیط TSI استفاده شد.

انجام روش دیسک دیفیوژن؛ حساسیت دارویی ایزوله های تولیدکننده متالوبتالاکتماز به روش انتشار دیسک در آگار(Disk diffusion) بر اساس رهنمودهای CLSI تعیین گردید(۱۷). جهت جداسازی سویه های حاوی متابوتالاکتماز از روش CDDT با استفاده از دیسک ایمی پنم و ایمی پنم / EDTA استفاده شد. برای انجام این آزمایش ابتدا محلول EDTA نیم مولار با حل کردن ۱/۱۸۶ گرم پودر EDTA در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه و PH آن را با استفاده از NaOH روی ۸ تنظیم و توسط اتوکلاو استریل شد. سپس حجمی از محلول که حاوی ۷۵۰ میکروگرم EDTA بود به دیسک های ایمی پنم اضافه و در انکوباتور خشک و در مرحله بعد سویه های مقاوم به ایمی پنم بر روی پلیت حاوی مولر هیتیون تلقیح گردید. در ادامه یک عدد دیسک ایمی پنم ۱۰ میکروگرمی که حاوی ۷۵۰ میکروگرم EDTA بود با فاصله مناسب در سطح پلیت قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه انکوبه شد. افزایش قطر هاله عدم رشد به میزان بیشتر یا مساوی ۷ میلی متر در اطراف دیسک ایمی پنم حاوی EDTA نسبت به دیسک ایمی پنم به تنهایی نشان دهنده تولید آنزیم متالوبتالاکتماز توسط باکتری مورد نظر می باشد.

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد(MIC) آنتی بیوتیک ها؛ حساسیت ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا بر اساس حداقل غلظت مهارکننده رشد با استفاده از روش رفت در آگار انجام شد. سپس نیم مک فارلن و محیط های مولر هیتیون آگار که دارای مقدار مشخصی آنتی بیوتیک های ایمی پنم، مروپنم، سفپیم، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، آمپی سیلین و پیراسیلین/تازو باکتری بودند

آویشن اثرات ضد عفوی کننده دارد. گاهی از انسس آن از طعم تند و گرم، به عنوان داروهای ضد تشنج و ضد روماتیسم آن در صنایع غذایی و از اثرات ضد عفوی کننده آن در صنایع بهداشتی در تهیه صابون های معطر یا در فرمول خمیر دندان ها و محلول های دهان شویه استفاده می شود. از ترکیبات موجود در گیاه آویشن ترکیبات فنولیک می باشد که از جمله آن ها به کارواکرول، تیمول، اوئنول، اشاره کرد(۱۲). اگر چه مطالعات مختلفی در مورد اثر عصاره های گیاهی روی سودوموناس آئروژینوزا انجام شده است؛ اما هیچ یک تأثیر ضد باکتریایی گزنه و آویشن شیرازی را روی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا حاوی آنزیم های متالو بتالاکتماز نشان نداده اند. لذا این مطالعه به منظور شناسایی ژن های متالو بتالاکتمازی bla IMP و bla VIM سودوموناس آئروژینوزا، تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد و بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره های متنانولی و استونی گیاهان گزنه و آویشن شیرازی بر سویه های بالینی و استاندارد سودوموناس آئروژینوزا حاوی ژن های متالوبتالاکتمازی bla IMP و bla VIM انجام گردید.

مواد و روش ها

این مطالعه از مهر تا بهمن سال ۱۳۹۳ بر روی بیماران مراجعه کننده به بخش سوانح و سوختگی بیمارستان مطهری شهر تهران انجام شد. به طوری که از عمق زخم های حاصل از سوختگی که ترشح داشتند و مشکوک به آلوودگی بودند نمونه گیری انجام شد.

نمونه گیری و تشخیص آزمایشگاهی؛ محل زخم بیماران با سرم فیزیولوژی شسته و به وسیله یک سواب استریل نمونه گیری انجام شد. سواب ها داخل محیط انتقالی استوارت به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انتقال یافتدند و روی محیط های سیتریماید آگار و مک کانکی آگار کشت داده شدند. محیط های کشت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و بعد از این مدت کلیه های رشد یافته جهت انجام تست های تشخیصی و افتراقی از نظر وجود باکتری

فارلن) به پلیت های حاوی عصاره ها اضافه و مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس نتایج مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت بعد از اثر عصاره ها روی سوش های استاندارد، تاثیر این عصاره ها بر باکتری های ایزوله شده از بیماران سوختگی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نوع مطالعه توصیفی-کاربردی-تجربی برای تجزیه و تحلیل آماری، از برنامه MINITAB13 استفاده گردید.

یافته های پژوهش

از مجموع ۴۴۸ بیمار دچار سوختگی مراجعه کننده به بیمارستان شهید مطهری تهران که مورد مطالعه قرار گرفتند، ۱۰۰ نمونه آلوده به سودوموناس آئروژینوزا جدا شد. از این میان ۸۳ سویه سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمی پنم و ۴۸/۹ (درصد) تولیدکننده MBL بودند. همه سویه های تولیدکننده MBL سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به مروپن، ایمی پنم، سفتازیدیم، آمیکاسین، توپرامایسین، سیپروفلوکساسین، آزترونام، پیپراسیلین/تازوپاکتم، سفتریاکسون، سفپیم و کاربینی سیلین بودند. در حالی که ۴۹ درصد از ایزوله ها مقاوم به جنتامایسین بودند. ۱۰۰ درصد ایزوله ها MDR بودند (به بیش از ۳ آنتی بیوتیک از کلاس های مختلف مقاوم بودند). این باکتری از طریق مکانیسم های مختلفی نسبت به داروهای خدمیکروبی مقاوم می شود که تغییر نفوذپذیری میکرووارگانیسم نسبت به داروها، پمپ افلاکس، تغییر گیرنده برای داروها، دستیابی به مسیرهای متابولیک فرعی و تولید آنزیم های تخریب کننده داروها از آن جمله می باشد. از بین مکانیسم های فوق، تولید آنزیم های تخریب کننده داروها از مهم ترین روش ها برای کسب فاکتور مقاوم است که سبب تخریب داروی فعال می شود. بخش قابل توجهی از ژن های کدکننده این آنزیم ها توسط عناصر متحرک ژنتیکی مانند پلاسمید، ترانسپوزون ها و باکتریوفاژها انتشار می یابند. در سال های اخیر انتقال ژن های بسیاری از آنزیم های جدید توسط اینتگرون ها توجه زیادی از محققین را به خود جلب کرده است (۲۱-۱۸). حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) آنتی بیوتیک های مختلف برای سویه

تهیه گردید. در مرحله بعد با استفاده از دستگاه Hand inoculators (شرکت MAST) عمل تلقیح حدود ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بر روی محیط های کشت مولر هیبتون آگار حاوی رقت های مختلف آنتی بیوتیکی انجام گردید. بعد از ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد پلیت ها بررسی شدند.

انجام روش PCR Sequencing برای شناسایی ژن های blaIMP و blaVIM در سویه های سودوموناس آئروژینوزا ایزوله شده با استفاده از دما و پرایمرهای اختصاصی این ژن ها انجام گرفت. ۰/۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده و PCR MASTER میکرولیتر از هر پرایمر به کیت (شرکت Bionner کره جنوبی) با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر اضافه گردید. از سویه های سودوموناس آئروژینوزا حاوی ژن های blaIMP و blaVIM به عنوان کنترل مثبت و از مارکر ۱۰۰ نوکتوئیدی برای تایید وزن مولکولی استفاده شد. الکتروفورز نمونه ها در ژل آگار ۱ درصد انجام و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید نتایج با دستگاه Gel doc (BIO-RAD) با نور UV مشاهده گردید. محصول PCR با استفاده از کیت شرکت Bionner ساخت کشور کره جنوبی خالص سازی و برای تایید به شرکت مذکور فرستاده شد.

عصاره گیری: عصاره گیاه های گزنه و آویشن شیرازی به روش خیساندن تهیه و ۲۰ گرم از پودر هر یک از گیاهان به طور جداگانه و همراه با متابول و استون به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی گذاشته شد. سپس صاف و در حرارت آزمایشگاه قرار گرفت تا خشک شود و تازمان انجام آزمایشات در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) عصاره ها: ابتدا عصاره گزنه و آویشن شیرازی در DMSO حل گردید و سپس مقدار معینی از محلول های تهیه شده به محیط های مولر هیبتون آگار اضافه شد. محیط های حاوی هر یک از عصاره ها در داخل پلیت های استریل پخش گردید. برای انجام ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون (معادل نیم مک

به عنوان VIM مثبت گزارش نشد. هم چنین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد(MIC) عصاره های متانولی و استونی گیاهان گزنه و آویشن شیرازی برای سویه های تولیدکننده IMP بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر(mg/ml) تعیین گردید(جدول شماره ۲).

های تولیدکننده IMP بر حسب میکرو گرم بر میلی لیتر (µg/ml) تعیین شد(جدول شماره ۱). تست PCR جهت شناسایی بتالاکتمازهای bla IMP (587bp) و bla VIM (382bp) توسط پرایمرهای VIM با توالی نوکلئوتیدی ارائه شده در جدول شماره ۳ انجام شد. شش نمونه IMP مثبت ولی هیچ نمونه ای

جدول شماره ۱. حداقل غلظت ممانعت کننده ای از رشد(MIC) آنتی بیوتیک ها برای سویه های سودوموناس آنروژینوزا تولیدکننده IMP

FSH2IMP	FSH22IMP	FSH28IMP	FSH40IMP	FSH42IMP	FSH47IMP	آنتی بیوتیک
۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸	ایمی پنم
۶۴	۳۲	۶۴	۶۴	۶۴	۶۴	مرپونم
۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸	سفپیم
۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	سفتاژیدیم
۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	سفوتابکسیم
۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	آمپی سیلین
۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	پیراسیلین/تازوباتام
۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	۲۵۶≥	سفتریاکسون

جدول ۲. حداقل غلظت ممانعت کننده ای از رشد (MIC) عصاره ها برای سویه های سودوموناس آنروژینوزا تولیدکننده IMP

سویه سودوموناس آنروژینوزا	آویشن شیرازی			
	عصاره متوسط	عصاره استونی	عصاره متانولی	گزنه
FSH2IMP	۶/۲۵	۶/۲۵	۶/۲۵	۲/۵
FSH22IMP	۶/۲۵	۶/۲۵	۶/۲۵	۲/۵
FSH28IMP	۶/۲۵	۶/۲۵	۶/۲۵	۲/۵
FSH40IMP	۶/۲۵	۶/۲۵	۶/۲۵	۲/۵
FSH42IMP	۶/۲۵	۶/۲۵	۶/۲۵	۲/۵
FSH47IMP	۶/۲۵	۶/۲۵	۶/۲۵	۲/۵
ATCC27853	۱/۵۶	۱/۵۶	۱/۵۶	۱/۵۶

جدول ۳. توالی نوکلئوتیدی پرایمها

توالی نوکلئوتیدی	نام پرایمر
5' -GTTTGGTCGCATATCGAAC-3'	VIM-F
5' -AATGCCAGCACCAAGGATAG-3'	VIM-R
5' -GAAGGCCTTATGTTCATAC-3'	IMP-F
5' -GTATGTTCAAGAGTGATGC-3'	IMP-R

دلیل تولید آنزیم های متالوبتاالاکتماز با مشکل رو برو است؛ زیرا سویه های سودوموناس آنروژینوزا حاوی این آنزیم ها قادرند تقریباً تمامی آنتی بیوتیک های بتالاکتم را هیدرولیز کند و همواره از علل اصلی مرگ

بحث و نتیجه گیری
سودوموناس آنروژینوزا یک پاتوژن فرصت طلب است که در افراد با نقص سیستم ایمنی بیماری ایجاد می کند. درمان عفونت های ناشی از این باکتری به

باشند(۲۶). در سال ۲۰۰۷، بهزادیان نژاد در دانشگاه تربیت مدرس با انجام آزمایش PCR و Etest MBL روی ۱۲۶ سویه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های بالینی بیمار ان غیر سوختگی در بیمارستان بقیه الله و شریعتی نشان دادند که هشت سویه(۱۱) درصد از ۷۰ سویه مقاوم به ایمی پنم تولیدکننده متالوبتاالاکتماز هستند و هر هشت سویه حامل ژن VIM بودند(۲۷). البرزی و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش دادند که آویشن شیرازی بر روی سودوموناس های جدا شده از بخش سوختگی موثر می باشد(۲۸). میثاقی و آخوندزاده در سال ۲۰۰۷ اثر غلظت های مختلف انسانس آویشن شیرازی، نیسین و PH را روی باکتری باسیلوس سرتوس مطالعه کرده و نشان دادند که انسانس آویشن شیرازی دارای اثر سینتریسم با نیسین بوده و این اثر با کاهش PH افزایش می یابد(۲۹). با توجه به اهمیت مشکلات به وجود آمده در درمان، بررسی عصاره های گیاهی اهمیت بیشتری پیدا کرده است. نتایج تحقیق پرواستوس و همکاران نشان داد که عصاره متابولی گزنه بر باکتری های استافیلوكوکوس اورئوس، باسیلوس سرتوس، لیستریا مونوسایتوژنز اثر ضد میکروبی قوی دارد(۳۰). کاوالی و همکاران در سال ۲۰۰۳ تاثیر عصاره اتابولی گزنه را روی سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلی و استافیلوكوکوس اورئوس به اثبات رساندند(۳۱). تفاوت در تاثیر عصاره های گیاهی بر باکتری ها به عوامل مختلفی بستگی دارد که از آن میان می توان به نوع گیاه، منطقه جغرافیایی رویش گیاه، روش خشک کردن گیاه، غلظت عصاره و نوع حلال اشاره نمود. البرزی و همکاران در مطالعه ای در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که آویشن شیرازی روی سویه های سودوموناس آئروژینوزا ایزوله شده از بیماران بخش سوختگی موثر بوده است(۳۲). هم چنین شریفی فر و همکاران نشان دادند که عصاره گیاه آویشن شیرازی روی سویه های استاندارد استافیلوكوکوس اورئوس و اشرشیاکلی موثر می باشد(۱۲).

و میر به ویژه در بیماران مبتلا به سوختگی های شدید می باشد(۲۲). بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیک انجام شده در سراسر جهان، اثبات شده است که میزان شیوع الگوهای مختلف مقاومت به ویژه ژن های کدکننده آنزیم های متالوبتاالاکتماز در سویه های سودوموناس آئروژینوزا، به علت این که روی پلاسمید و اینتگرون قرار دارند، از منطقه ای به منطقه دیگر و حتی بین بیمارستان های مختلف یک ناحیه جغرافیایی می تواند متفاوت باشد(۲۳). نتایج مطالعه ما نشان داد که ۸۳ ایزوله به ایمی پنم مقاوم بود که از این میان مشخص شد ۴۸ ایزوله حاوی متالوبتاالاکتماز بودند. در این مطالعه تمامی سویه های حاوی متالوبتاالاکتماز به آنتی بیوتیک های ایمی پنم، مروپنم، آمیکاسین، کاربینی سیلین، آزترونام، سیپروفلوکسازین، سفتازیدیم، سفوتاکسیم مقاومت نشان دادند. متابفانه میزان مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های جدا شده از سوختگی در ایران نسبت به سایر کشورها بیشتر است. در مطالعه فاضلی و همکاران در شهر اصفهان(سال ۱۳۸۷)، همه ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا به سفتازیدیم و تیکارسیلین مقاومت نشان دادند و نیز میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های ایمی پنم، پیپراسیلین و سیپروفلوکسازین ۹۴ درصد گزارش شد(۲۴). در مطالعه میرصالحیان و همکاران میزان مقاومت سویه های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران مبتلا به سوختگی ۷۵ درصد نسبت به ایمی پنم مقاومت گزارش شد(۲۳). در مطالعه انجام شده توسط در سال ۱۳۸۶ بر روی Shahcheraghi سویه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های بالینی بیماران غیر سوختگی در بیمارستان های امام خمینی و مرکز طبی کودکان نشان داد که ۳ درصد از سویه ها، تولیدکننده آنزیم متالوبتاالاکتماز هستند(۲۵). در سال ۲۰۰۷، Khosrav در اهواز با انجام آزمایش PCR، Etest MBL روی ۱۰۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا نشان داد که هشت سویه(۱۹/۵ درصد) از ۴۱ سویه مقاوم به ایمی پنم تولیدکننده متالوبتاالاکتماز هستند و هر هشت سویه حامل ژن VIM می

References

- 1.Harris AD, Smith D, Johnson JA, Bradham DD, Roghmann MC. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2007; 34:340-5.
- 2.Defez C, P Daures J. Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection. *J Hospital Infect* 2004; 57:209-16.
- 3.Akahane K, Sakai D, Furuya N, Komano T. Analysis of the pilu gene for the prepilin peptidase involved in the biogenesis of type IV pili encoded by plasmid R64. *Mol Genet Genomics* 2005;273:350-9.
- 4.Chambers D, Scott F, Bangur R, Davies R. Factors associated with infection by *Pseudomonasaeruginosa* in adult cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2005;26:651-6.
- 5.Ryall B, Davies JC, Wilson R, Shoemark A, Williams HD. *Pseudomonas aeruginosa*, cyanide accumulation and lung function in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis patients. *Eur Respir J* 2008; 32:740-7.
- 6.Hacker J, Carniel E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity—a Dar-winiān view of the evolution of microbes. *EMBO Rep* 2001;2:376-81.
- 7.Tramperstranders GA, Vander CK, Wolfs TF. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2005;54:37-43.
- 8.Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:414-24.
- 9.Villegas MV, Correa A, Perez F, Miranda MC, Zuluaga T, Quinn JP, et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;49:217-22.
- 10.Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:2990-5.
- 11.Altoparlak U, Aktas F, Celebi D. Acinetobacter baumannii isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates. *Burns* 2005; 31:707-10.
- 12.Sharififar F, Moshafi MH, Mansouri SH, Khodashenas M, Khoshnoodi M. Invitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic Zataria multiflora Boiss. *Food Control* 2007;18:800-5.
- 13.Karim A, Nouman M, Munir S, Sattar S. Pharmacology and Phytochemistry of Pakistani herbs and herbal drugs used for treatment of diabetes. *Int J Pharmacol* 2011;7:419-39.
- 14.Newell C, Anderson L, Philipson J. Herbal medicine: A guide for health care professionals. 2th ed. London: The Pharmaceutical Publication1996; P.147-9.
- 15.Chrubasik JE, Roufogalis BD, Wagner H, Chribasik S. A comprehensive review on the stinging nettle effect and efficacy profiles. *Phytomedicine* 2007;14:568-79.
- 16.Julia E, Chribasika, BDR. A comprehensive review on the stinging nettle effect and efficacy profiles. *Phytomedicine* 007; 4: 423-35.
17. Vogeser M, Seger C. Quality management in clinical application of mass spectrometry measurement systems. *Clin Biochem* 2016;9120:30137.
- 18.Hancock RE, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat* 2000;3:247-255.
- 19.Livermore DM. Of *Pseudomonas* porins pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:247-50.
- 20.Ochs MM, McCusker MP, Bains M, Hancock RE. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1085-90.
- 21.Severino P, Magalhaes VD. The role of integrons in the dissemination of antibiotic resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an intensive care unit in Brazil. *Res Microbiol* 2002; 153:221-6.
- 22.Yousefi S, Farajnia S, Nahaei MR, et al. Detection of metallo-beta-lactamase-encoding genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the Northwest of Iran. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 68: 322-5.

- 23.Mirsalehian A, Bahador A, Bigverdi R, Goli H. Prevalence of MBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Tehran Uni Med Sci J*2011;68:72-6.
- 24.Fazeli H, Moslehi Tekantapeh Z, Irajian GHR, Salehi M. Determination of drug resistance patterns and detection of blavim gene in *pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burned patients in the emam mosa Kazem hospital Isfahan, Iran (2008-9). *Iran J Med Microbiol*2010;3:1-8.
- 25.Shahcheraghi F, Nikbin V. [Metallo β -Lactamase and resistance rate of *P. aeruginosa* isolates to ceftazidim and imipenem]. *Iran J Inf Trop Dis* 2007;36:19-22.(Persian)
- 26.Khosravi AD, Mihani F. Detection of metallo-beta-lactamaseproducing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz Iran. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60:125-8.
- 27.Rezaeiyazdi H, Behzadiannejad G, Najarpeerayeh SH, Mostafaei M. Prevalence and detection of metallo- β -lactamase (MBL)-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from clinical isolates in Iran. *Ann Microbiol* 2007; 57:293-6.
- 28.Alborzi A, Oboodi B, Kalani M, Nasiri J. Comparison of the effects of zataria multiflora Extract by MIC Method against *Pseudomonas aeruginosa* with Floroquinolones, Imipenem and Ceftazidime by Conventional Method. *10th Int Congress Infect Diss*2002;11- 4.
- 29.Misaghi A, Akhondzadehbasti A. Effects of zataria multiflora boiss. *Food Cont*2007; 8: 1043 - 9.
- 30.Proestos C, Boziaris IS, Nychas JE, Komaitis M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chem* 2006;95:664-71.
- 31.Grosseveldmann B, Nurk NM, Smissen R, Breitwieser I, Quandt D, Weigend M. Pulling the sting out of nettle systematics: A comprehensive phylogeny of the genus *Urtica* L. (*Urticaceae*). *Mol Phylogenet Evol*2016;102:9-19.
- 32.Alborzi A, Oboodi B, Kalani M, Nasiri J. Comparison of the effects of zataria multiflora extract by mic method against *Pseudomonas aeruginosa* with Floroquinolones, Imipenem and Ceftazidime by conventional method. *10th Int Cong Infect 2002*; 2:11-14.



Investigating the Antibacterial Effect of Methanol and Acetone Extracts of *Urtica Dioica* and *Zataria Multiflora* against Metallo Beta-lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa*

Roshani M¹, Heydari M^{1}, Godaezi H¹, Hashemi A¹, Eslami G¹, Yosefi N¹*

(Received: May 23, 2015)

Accepted: February 18, 2015)

Abstract

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* is a major cause of nosocomial infections. Different mechanisms of drug resistance and acquired-resistance genes from other bacteria, caused the treatment of infections of this opportunistic pathogen with serious problems. So even with the newer antibiotics, the treatment has failed. The use of medicinal plants is one way to develop antimicrobial agents. Given the widespread use of *Urtica Dioica* and *Zataria multiflora* herbs in traditional medicine and the potential effects against many infectious agents are going to evaluate the antibacterial effect of methanol and acetone extracts of *Urtica Dioica* and *Zataria multiflora* against metallo beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* carrying bla VIM and bla IMP genes.

Materials & methods: This study was performed from October to February year 2014 on 448 burn patients hospitalized in Shahid Motahari Hospital, Tehran. For all MBL-producing strains, antibiotic resistance by disk diffusion method were done according to CLSI guidelines. CDDT method for detection of MBL and PCR and Sequencing methods for Identification of metallo beta-lactamase gene, bla IMP and bla VIM, were used. The minimum inhibitory concentrations of antibiotics meropenem, cefepime, ceftazidime, cefotaxime, ampicillin, piperacillin/tazobactam and ceftriaxone and the

minimum inhibitory concentration of methanol and acetone extracts of *Urtica Dioica* and *Zataria multiflora* herbs were done based on agar dilution method.

Findings: Among 83 imipenem resistant *P.aeruginosa* strains, 48 (57.9%) isolates produced MBL. PCR and sequencing methods confirmed that these strains were blaIMP-1 positive genes, whereas none were positive for bla (VIM) genes. Hospitalized burn patients with MBL-producing *P.aeruginosa* infection had 4/48 (8.3%) mortality rate. It was demonstrated that *Urtica Dioica* and *Zataria multiflora* extracts had a significant antibacterial effect on regular and IMP-producing *P. aeruginosa* strains.

Discussion & conclusions: Prevalence of MBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains among patients is high. Also due to high resistance of chemical drugs, the use of medicinal plants such as *Urtica Dioica* and *Zataria multiflora* can be a better alternative for treatment, which requires further studies. In this study the extracts of *U.dioica* and *Z. multiflora* had a high antibacterial effect against β-lactamase producing *P. aeruginosa* isolates.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Antibiotic resistance, *Urtica dioica*, *Zataria multiflora*, Metallo beta-lactamase

1. Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshty University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author Email: Mohsenheidary40@gmail.com