

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

مهدانه روشنی^۱، محسن حیدری^{۱*}، 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 دریافت: ۹۴/۳/۲

تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۱۴

چیکنده

مقدمه: سودوموناس آئروژینوزا از عوامل عمده 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 متانولی آن ها را روی سودوموناس آئروژینوزا حاوی ژن های متالوبتالاکتامازی 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 متالوبتالاکتاماز از روش CDDT (ایمی پنم-ایمی پنم+ EDTA) و جهت شناسایی ژن های متالوبتالاکتامازی 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 متالوبتالاکتاماز تشخیص داده شدند. از این تعداد ۶ سویه حاوی ژن bla IMP بودند اما هیچ یک ژن bla VIM را نداشتند. این مطالعه نشان داد که عصاره های متانولی و استونی گزنه و آویشن شیرازی روی سویه های سودوموناس آئروژینوزا تولید کننده IMP اثر داشتند.

بحث و نتیجه گیری: شیوع سودوموناس آئروژینوزا تولیدکننده متالوبتالاکتاماز 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، متالوبتالاکتاماز

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

Email: Mohsenheidary40@gmail.com

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 فیبروز سیستیک می باشد (۵،۶). هم چنین این باکتری باعث ایجاد سپتی سمی، پنومونی، اندوکاردیت و عفونت های دستگاه ادراری، پوست، گوش و چشم می گردد (۷) و به عنوان یک تهدید بسیار جدی برای بیماران بستری در بیمارستان های سراسر دنیا به شمار می آید (۸). 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 (۶،۷). 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، متالوبتالاکتاماز (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 مونوباکتام مقاوم می کنند (۱۰). هم چنین متالوبتالاکتامازها بر روی عناصر ژنتیکی (ترانسپوزون و پلاسمیدها) وجود دارند و قادر به هیدرولیز آنتی بیوتیک های کاربامپنم و تقریباً همه عوامل دارویی بتالاکتام 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 آن 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 آن ها شده اند که البته با مصرف این داروها نیز مشکلاتی از قبیل مقاومت روز افزون در

میکروارگانسیم ها و کاهش تاثیر در اثر کاربرد مداوم ایجاد شده است (۱۲). درمان به وسیله گیاهان دارویی در مقایسه با داروهای صنعتی، 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 پرز بوده و محل رویش آن شمال غرب و مرکز ایران می باشد. ترکیبات گزنه شامل ترکیبات آلدوست مانند فلاوونوئیدها، لکترین، پلی ساکاریدها، اسید استیک و اسید بوتیریک است (۱۴). 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 (۱۴). به تازگی از این گیاه در درمان بیماری های عفونی و آرتريت استفاده شده است. از دیگر کاربردهای دارویی گزنه می توان به درمان عفونت مثانه و مجاری ادراری، بزرگ شدگی پروستات، حساسیت فصلی و درمان آکنه اشاره نمود (۱۵). در کشورهای اروپایی نیز از گزنه به منظور کاهش التهاب مفاصل و درمان آرتريت روماتوئید استفاده می شود (۱۶). 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- زاتاریاکه گونه ای از آن در جنوب ایران موجود است و به آویشن شیرازی یا پهن برگ معروف است. ۲- یزیزفورا: است جنس آویشن باریک برگ گونه ای از آن است. ۳- جنس تیموس که بسیار متنوعند 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.

آویشن اثرات ضد عفونی کننده دارد. گاهی از اسانس آن از طعم تند و گرم، به عنوان داروهای ضد تشنج و ضد روماتیسم آن در صنایع غذایی و از اثرات ضد عفونی 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، اوژنول، اشاره کرد (۱۲). اگر چه مطالعات مختلفی در مورد اثر عصاره های گیاهی روی سودوموناس آئروژینوزا انجام شده است؛ اما هیچ یک تاثیر ضد باکتریایی گزنه و آویشن شیرازی را روی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا حاوی آنزیم های متالو بتالاکتاماز نشان نداده اند. لذا این مطالعه به منظور شناسایی ژن های متالو بتالاکتامازی bla IMP و bla VIM سودوموناس آئروژینوزا، تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد و بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره های متانولی و استونی گیاهان گزنه و آویشن شیرازی بر سویه های بالینی و استاندارد سودوموناس آئروژینوزا حاوی ژن های متالو بتالاکتامازی 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 آلودگی 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 یافتند و روی محیط های سیتیریماید 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 کلنی های رشد یافته جهت انجام تست های تشخیصی و افتراقی از نظر وجود باکتری

سودوموناس آئروژینوزا مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس کلنی های مشکوک از نظر رنگ، تولید پیگمان، 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 قند، رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد، تست حرکت و محیط TSI استفاده شد.

انجام روش دیسک دیفیوژن: حساسیت دارویی ایزوله های تولیدکننده متالو بتالاکتاماز به روش انتشار دیسک در آگار (Disk diffusion) بر اساس رهنمودهای CLSI تعیین گردید (۱۷). جهت جداسازی سویه های حاوی متالو بتالاکتاماز 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 هینتون 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 متالو بتالاکتاماز توسط باکتری مورد نظر می باشد.

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC): آنتی بیوتیک ها: حساسیت ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا براساس حداقل غلظت مهارکننده رشد با استفاده از روش رقت در آگار انجام شد. سپس نیم مک فارلند و محیط های مولر هینتون آگار که دارای مقدار مشخصی آنتی بیوتیک های ایمی پنم، مروپنم، سفپیم، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، آمپی سیلین و پپراسیلین/تازوباکتام بودند

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 هیتتون اگر 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 و Sequencing روش 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 ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر به کیت PCR MASTER (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 نوکلئیدی 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 متانول واستون به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی گذاشته شد. سپس صاف و در حرارت آزمایشگاه قرار گرفت تا خشک شود و تا زمان 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 هیتتون آگار اضافه شد. محیط های حاوی هر یک از عصاره ها در داخل پلیت های استریل پخش گردید. برای انجام MIC ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون (معادل نیم مک

فارلند) 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 ایمنی پنم و ۴۸ (۵۷/۹ درصد) تولیدکننده MBL بودند. همه سویه های تولیدکننده MBL سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به مروپنم، ایمنی پنم، سفنازیدیم، آمیکاسین، توبرامایسین، سیپروفلوکساسین، آزترونام، پپراسیلین/تازوباکتام، سفتریاکسون، سفپیم و کاربنی 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 ضد میکروبی مقاوم می شود که تغییر نفوذپذیری میکروارگانیسم 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 مقاومت 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

های تولیدکننده IMP برحسب میکرو گرم بر میلی لیتر ($\mu\text{g/ml}$) تعیین شد (جدول شماره ۱). تست PCR جهت شناسایی بتالاکتامازهای (bla IMP (587bp) و (bla VIM (382bp) توسط پرایمرهای IMP و VIM با توالی نوکلئیدی ارائه شده در جدول شماره ۳ انجام شد. شش نمونه IMP مثبت ولی هیچ نمونه ای

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 برحسب میلی گرم بر میلی لیتر (mg/ml) تعیین گردید (جدول شماره ۲).

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

آنتی بیوتیک	FSH47IMP	FSH42IMP	FSH40IMP	FSH28IMP	FSH22IMP	FSH2IMP
ایمی پنم	۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸
مروپنم	۶۴	۶۴	۶۴	۶۴	۳۲	۶۴
سفپیپم	۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸
سفتازیدیم	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256
سفتاکسیم	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256
آمپی سیلین	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256
پیپراسیلین/تازوباکتام	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256
سفترباکسون	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256

جدول ۲. حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد (MIC) عصاره ها برای سویه های سودوموناس آئروژینوزا تولید کننده IMP

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

جدول ۳. توالی نوکلئیدی پرایمرها

نام پرایمر	توالی نوکلئیدی
VIM-F	5' -GTTTGGTCGCATATCGCAAC-3'
VIM-R	5' -AATGCGCAGCACCAGGATAG-3'
IMP-F	5' -GAAGGCGTTTATGTTTCATAC-3'
IMP-R	5' -GTATGTTTCAAGAGTGATGC-3'

بحث و نتیجه گیری

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

دلیل تولید آنزیم های متالوتالاکتاماز با مشکل روبرو است؛ زیرا سویه های سودوموناس آئروژینوزا حاوی این آنزیم ها قادرند تقریباً تمامی آنتی بیوتیک های بتالاکتام را هیدرولیز کنند و همواره از علل اصلی مرگ

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 اله و شریعتی نشان دادند که هشت سویه(۱۱ درصد) از ۷۰ سویه مقاوم به ایمنی پنم تولیدکننده متالوبتالاکتاماز 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 اسانس آویشن شیرازی، نیسین و PH را روی باکتری باسیلوس سرئوس مطالعه کرده و نشان دادند که اسانس آویشن شیرازی دارای اثر سینرژسم 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 متانولی گزنه بر باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، لیستریا مونوسایتوژنز اثر ضد میکروبی قوی دارد(۳۰). کاوالی و همکاران در سال ۲۰۰۳ تاثیر عصاره اتانولی گزنه را روی سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس 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 استافیلوکوکوس 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 متالوبتالاکتاماز در سویه های سودوموناس آئروژینوزا، به علت این که روی پلاسמיד 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 ایمنی پنم مقاوم بود که از این میان مشخص شد ۴۸ ایزوله حاوی متالوبتالاکتاماز بودند. در این مطالعه تمامی سویه های حاوی متالوبتالاکتاماز به آنتی بیوتیک های ایمنی پنم، مروپنم، آمیکاسین، کاربنی سیلین، آزترونام، سیپروفلوکسازین، سفنازیدیم، سفوتاکسیم مقاومت نشان دادند. متاسفانه 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 سفنازیدیم و تیکارسیلین مقاومت نشان دادند و نیز میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های ایمنی پنم، پپراسیلین 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 ایمنی پنم مقاومت گزارش شد(۲۳). در مطالعه انجام شده توسط در سال ۱۳۸۶ بر Shahcheraghi بر روی ۳۵۰ 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 متالوبتالاکتاماز هستند(۲۵). در سال ۲۰۰۷، Khosrav در اهواز با انجام آزمایش Etest، PCR، MBL روی ۱۰۰ سویه سودوموناس آئرو ژینوزا نشان داد که هشت سویه(۱۹/۵ درصد) از ۴۱ سویه مقاوم به ایمنی پنم تولیدکننده متالوبتالاکتاماز 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 *Pseudomonas aeruginosa* 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 Darwinian 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. Altöparlak 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. *In vitro* 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 Publication 1996; P.147-9.
15. Chrubasik JE, Roufogalis BD, Wagner H, Chrubasik S. A comprehensive review on the stinging nettle effect and efficacy profiles. *Phytomedicine* 2007;14:568-79.
16. Julia E. Chrubasika, BDR. A comprehensive review on the stinging nettle effect and efficacy profiles. *Phytomedicine* 2007; 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 *bla* 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-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz Iran. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60:125-8.
27. Rezaei Yazdi H, Behzadiannejad G, Najarpourayeh 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. Grossevelldmann 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 Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author Email: Mohsenheidary40@gmail.com