Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.43; No.2; 2019

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 21:52 +0430 on Monday September 16th 2019

Determining Antibacterial Activity of 19 Medicinal Plant Extracts on Standard and Clinical Strains of Pseudomonas aeruginosa and Synergistic Activity of the Most Active Extract with Ceftazidime

Atefeh Salari, Zahra Zahir Nia, Shahla Mansouri*

Microbiology and Virology Department, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences

(Received:2018/06/17 Accept: 2019/02/20)

Abstract

Background: *The emergence of multidrug-resistant (MDR) strains of P aeruginosa has become a serious concern today. This bacterium is resistant to a wide range of antimicrobial drugs. There are several ways to treat and control infections caused by MDR bacteria. One of these methods is to find active plant compounds with antimicrobial properties and antimicrobial combination of herbal plants with antibacterial agent with synergistic effects. The aim of the present study was to investigate the antimicrobial effects of 19 aqueous, ethanoic, and methanolic extracts of medicinal plants on standard and MDR strains of P. aeruginosa. At the end, the synergistic effect of the most active plant extract with ceftazidime was evaluated.*

Methods: *Antimicrobial activity of medicinal plants was investigated using agar dilution method on five ceftazidime sensitive and 20 MDR clinical isolates of P.aeroginosa resistance to ceftazidime with an MIC range of 64-1024 µg/ml. After determining the best extract, its antimicrobial effect with ceftazidime was investigated by agar dilution using checkerboard assay.*

Results: *Methanolic and ethanolic extracts of Quercus infectoria with concentration of 1000 µg/ml inhibits the growth of all standard and clinical strains of P. aeruginosa. The water extract of Quercus infectoria and methanolic and ethanolic extract of Eucalyptus galbie and Myrtus communis also reduced the growth at this concentration but did not inhibit the growth completely. The results showed that the synergistic effects of methanolic extract of Quercus infectoria and ceftazidime were significant and the MIC of the drug decreased from 1024 µg/ml to 4 µg/ml, and also the MIC of the extract was reduced to four folds of MIC.*

Conclusion: *It was shown that the most effective extracts against Pseudomonas aeruginosa are methanolic and ethanoic extracts of Quercus infectoria, which have significant synergistic effects with ceftazidime.*

Keywords: *P. aeruginosa; Quercus infectoria; Synergism; Ceftazidime*

* *Corresponding Author: Shahla Mansouri*
Email:smansouri@kmu.ac.ir

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ۴۳، شماره ۲، ۱۳۹۷، صفحات ۹۰ تا ۹۶

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 21:52 +0430 on Monday September 16th 2019

بررسی آثار ضدمیکروبی ۱۹ گیاه دارویی بر سویه‌های استاندارد و بالینی پسودوموناس آئروژینوزا و اثر سینرژیسم موثرترین عصاره با آنتی بیوتیک سفتازیدیم

عاطفه سالاری، زهرا ظهیر نیا، شهلا منصوری*

گروه میکروبیولوژی و ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تاریخ دریافت مقاله:۱۳۹۷/۰۳/۲۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۱۲/۰۱

چکیده:

سابقه وهدف: تظهور سویه‌های مقاوم به چند دارو *MDR* پسودموناس آئروژنز امروزه به یک نگرانی جدی تبدیل شده است. این باکتری به طیف وسیعی از داروهای ضد میکروبی مقاوم است. روش‌های مختلفی برای درمان و کنترل عفونت ناشی از باکتری‌های *MDR* وجود دارد. یکی از این روش‌ها پیدا کردن ترکیب‌های فعال گیاهی است که با ترکیب داروهای ضد میکروبی دارای آثار سینرژیسم با یکدیگر باشند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی ۱۹ گیاه دارویی روی سویه‌های استاندارد و همچنین سویه‌های بالینی مقاوم به چند دارو (*MDR*) پسودوموناس ائروژینوزا است. در نهایت اثر سینرژیسم بهترین عصاره با آنتی بیوتیک سفتازیدیم بررسی شد.

موادوروش‌ها: فعالیت ضد میکروبی گیاهان دارویی به روش رقت در آگار برای پنج سویه استاندارد پسودوموناس ایروژنز حساس به سفتازیدیم و ۲۰ سویه کلینیکی *MDR* و با *MIC* بین ۶۴ تا ۱۰۲۴ میکروگرم برمیلی‌لیتر بررسی شد و بعد از تعیین موثرترین عصاره اثر ضد میکروبی آن با آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم به روش چکربورد در آگار بررسی شد.

نتایج: عصاره متانولی و اتانولی گیاه مازو با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر قادر به مهار از رشد تمام سویه‌های استاندارد و بالینی پسودوموناس آئروژینوزا بود. عصاره آبی مازو و عصاره متانولی و اتانولی مورد و اکالیپتوس نیز در این غلظت سبب کاهش از رشد باکتری شدند، ولی ممانعت کامل از رشد دیده نشد. آثار سینرژیسم بین عصاره متانولی مازو و سفتازیدیم بسیار قابل ملاحظه بوده و *MIC* دارو از ۱۰۲۴ *μg| ml* به ۴ *μg | ml* تنزل داشته و همچنین عصاره نیز به میزان چهار برابر کاهش *MIC* داشته است.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد موثرترین عصاره علیه پسودوموناس آئروژینوزا، عصاره متانولی و اتانولی مازو بوده و آثار سینرژیسم بارزی با سفتازیدیم دارد.

واژگان کلیدی: پسودوموناس ائروژینوزا، گیاه مازو، سینرژیسم، سفتازیدیم

مقدمه:

گسترش بیماری‌های میکروبی مقاوم به دارو یکی از جدی‌ترین تهدیدها برای درمان موفقیت‌آمیز بیماری‌های عفونی است(۱). پسودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی، غیر تخمیری، متحرک و فرصت‌طلب است که می‌تواند عفونت‌های بیمارستانی، عفونت‌های مجاری ادراری، عفونت‌های دستگاه گوارش، کراتیت، اوتیت و باکتریمی را در بیماران با نقص سیستم ایمنی ایجاد کرده و سبب مرگ و میر قابل ملاحظه در بیماران عفونی شود. در حال حاضر پسودوموناس آئروژینوزا نقش برجسته‌ای را در عفونت‌های بیمارستانی در سراسر جهان ایفا می‌کند به طوری که این باکتری را مسئول ۱۰تا۱۵ درصد عفونت‌های بیمارستانی در جهان می‌دانند(۲). پسودوموناس آئروژینوزا در بسیاری از محیط‌ها یافت شده، در شرایط هوازی رشد کرده و در نبود اکسیژن نیز می‌تواند با استفاده از نیترات به جای اکسیژن به صورت بی‌هوازی رشد کند. این باکتری توسط فاکتورهای مختلف ویرولانس سبب ایجاد بیماری می‌شود؛ بنابراین به عنوان باکتری مشکل‌ساز در درمان، در سراسر جهان شناخته شده است(۳). پسودوموناس آئروژینوزا به طور ذاتی به بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم است که دلیل آن می‌تواند نفوذپذیری پایین غشای خارجی باکتری، وجود پمپ های برون‌ریز(efflux pump) و ترشح آنزیم‌هایی باشد که سبب غیرفعال کردن عوامل ضدمیکروبی می‌شود. همچنین این باکتری با انتقال افقی می‌تواند ژن‌های مقاومت را کسب کند(۴). ظهور سویه‌های MDR1 پسودوموناس آئروژینوزا امروزه به یک نگرانی جدی تبدیل شده است به دلیل اینکه

۱

نویسنده مسئول: دکتر شهلا منصوری
پست الکترونیک: *smansouri@kmu.ac.ir*

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 21:52 +0430 on Monday September 16th 2019

این باکتری به طیف وسیعی از داروهای ضد میکروبی مقاوم بوده و همین مسئله سبب افزایش هزینه‌های بیمارستانی می‌شود(۵). عفونت‌های مقاوم، سبب افزایش میزان مرگ‌ومیر و هزینه‌های درمانی شده و گسترش بیماری و طول مدت درمان را تحت تاثیر قرار می‌دهند(۶). مطالعه‌های متعددی افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها را در پسودوموناس آئروژینوزا اثبات کرده است(۱). میزان مقاوت نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها در این باکتری به شدت بالا رفته، به خصوص در کشورهای در حال توسعه روندها به صورت افزایشی است.با وجود این واقعیت که بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های جدید به طور صنعتی سنتز می‌شوند کنترل بیماری‌های عفونی به طور جدی به وسیله افزایش مداوم میکروارگانیسم‌های مقاوم در برابر داروهای ضدمیکروبی شیمیایی تهدید می‌شود. چنین حقیقتی سبب نگرانی شدید است چرا که سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR :Multiple Drug Resistant) باکتریایی جدید توسعه می‌یابند. این مسائل و مشکلات نیاز فوری به استراتژی‌های جدید و یافتن داروهای ضد میکروبی جدید را نشان می‌دهد(۶). ترکیب‌های مشتق شده از گیاهان می‌توانند سبب یافتن داروهای ضدمیکروبی جدید با سمیت کمتر، طیف گسترده‌تر و فارماکوکینتیک مناسب شوند و شاید بتوان از این داروها بدون تغییر شیمیایی استفاده کرد. بنابراین گیاهانی که در مقدار کم دارای آثار ضد میکربی باشند باید برای تشخیص خواص درمانی، ایمنی و کارایی بررسی شوند(۶). از دیرباز تاکنون، گیاهان به واسطه خواص دارویی موجود در ترکیب‌های آن‌ها، به طور گسترده در طب سنتی و پزشکی نوین استفاده می‌شوند. به نظر می‌رسد آثار جانبی گیاهان در برابر آنتی‌بیوتیک‌های صناعی کمتر باشد و به همین دلیل گیاهان دارویی از محبوبیت زیادی برای درمان عفونت‌های باکتریایی برخوردارند(۷). روش‌های مختلفی برای برای درمان و کنترل عفونت ناشی از باکتری‌های MDR وجود دار؛ مانند جداسازی ترکیب‌های فعال گیاهی با خواص ضد میکروبی و ترکیب داروهای ضد میکروبی گیاهی با شیمیایی که دارای آثار سینرژیسم با یکدیگر باشند(۸). مطالعه‌های مختلفی آثار سینرژیک ترکیب آنتی‌بیوتیک‌ها را با عصاره‌های خام گیاهی علیه باکتری‌ها گزارش کرده‌اند(۶،۸).

هدف از این مطالعه، تعیین اثر ضد میکروبی عصاره های آبی، اتانولی و متانولی ۱۹ گیاه که در طب سنتی آثار ضد میکروبی داشته‌اند(۹،۱۰) روی سویه‌های استاندارد و بالینی پسودوموناس ائروژینوزا و بررسی اثر سینرژیسم بهترین عصاره با آنتی بیوتیک سفتازیدیم است.

مواد و روش‌ها:

گیاهان استفاده شده در این بررسی یا به صورت تازه از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری یا از عطاری‌های معتبر سطح شهر خریداری شدند. در هر مورد گیاهان توسط مرکز تحقیقات داروهای گیاهی در دانشکده داروسازی شناسایی شده و ار هر گیاه یک نمونه تایید شده در این مرکز ذخیره شد.

۱.تهیه عصاره آبی، متانولی و اتانولی گیاهان: عصاره ۱۹ گیاه مختلف (جدول شماره ۱) به روش خیساندن تهیه شد. برای تهیه عصاره ۲۰ گرم از پودر هر گیاه به طور مجزا در حلال اتانول ، متانول) Merckآلمان) یا آب اضافه شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در حلال خیسانده و در تاریکی قرار داده شد. سپس عصاره‌ها صاف شدند و در حرارت آزمایشگاه قرار گرفتند تا خشک شوند و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند(۱۱).

۲. سویه‌های میکروبی استفاده شده: سویه‌های میکروبی که در این مطالعه استفاده شد شامل پنج سویه استاندارد پسودوموناس آئروژینوزا شامل PAO.wild، PAO1(MH873)، PDO 300(mucA2e)، ATCC27853 و MS.PS.50/30بود که تماما به سفتازیدیم حساس بودند و میزان حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد در برابر سفتازیدیم (شرکت جابربن حیان، ایران) برای ایزوله ها بین یک تا چهار میکروگرم

جدول ۱: نام علمی ، خانواده و قسمت استفاده شده گیاهان در این بررسی

نام گیاه	نام علمی	قسمت مورد بررسی	خانواده
رزماری	*Rosmarinus officinalilis*	سرشاخه هوایی	*Lamiaceae*
مورد	*Myrtus communis*	برگ	*Myrtaceae*
مازو	*Quercus infectoria*	گال	*Fagaceae*
اکالیپتوس	*Eucalyptus galbie*	برگ	*Myrtaceae*
نعنا	*Mentha piperita*	برگ	*Lamiaceae*
جینسینگ	*Panax ginseng*	ریشه	*Aralioideae*
هلیله سیاه	*Terminalia chebulla*	میوه	*Combretaceae*
آویشن	*Zataria multiflora*	سرشاخه هوایی	*Lamiaceae*
میخک	*Sizigium aromaticus*	سرشاخه هوایی	*Caryophyllaceae*
چای کوهی	*Hypericum perforayum*	سرشاخه هوایی	*Hypericaceae*
آلوئه ورا	*Aloe vera*	صمغ	*Aloaceae*
کندر	*Boswellia sacra*	صمغ	*Burseraceae*
سنجد	*Elaeagnus angustifolia*	میوه	*Elaeagnaceae*
سیاه دانه	*Nigella sativa*	دانه	*Ranunculaceae*
سرخار گل	*Echinacea angustifolia*	سرشاخه هوایی	*Asteraceae*
رازیانه	*Foeniculum vulgare*	میوه	*Apiaceae*
گزنه	*Urtica dioica*	سرشاخه هوایی	*Urticacea*
شیرین بیان	*Glycyrrhiza glabra*	سرشاخه هوایی	*Fabaceae*
برگ بو	*Laurus nobilis*	برگ	*Lauraceae*

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 21:52 +0430 on Monday September 16th 2019

برمیلی‌لیتر بود. علاوه بر آن ۲۰ ایزوله پسودوموناس آئروژینوزا با MIC بین که تماما نسبت به آنتی بیوتیک‌های ایمی پنم، سفتازیدیم، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، پیپراسیلین و کاربنی سیلین مقاوم بودند و در بخش میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی افضلی پور کرمان شناسایی شده و اثر ضد میکروبی آن‌ها تایید شده بود، بررسی شدند.

۳. تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد(MIC) عصاره‌ها به روش آگار دایلوشن: ابتدا عصاره‌ها در DMSO حل شد و سپس مقدار معینی از محلول‌های تهیه شده به محیط‌های مولر هینتون آگار اضافه شد و غلظت‌های ۲۰۰۰و ۱۰۰۰و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره تهیه شد. محیط‌های حاوی هریک از عصاره‌ها در داخل پلیت‌های استریل پخش شد. سوسپانسیون میکروبی نمونه های بررسی شده با کدورت معادل کدورت استاندارد نیم مک فارلند تهیه و به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شد و سپس ۱۰ میکرولیتر به روی محیط کشت حاوی عصاره تلقیح شد. بعد ازخشک شدن پلیت ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. به عنوان کنترل مثبت در پلیتی که فقط حاوی محیط مولر هینتون آگار است به میزان مساوی باکتری تلقیح کردیم. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد نتایج بررسی شدند(۱۲). برای هر رقت باکتری سه پلیت در نظر گرفته شد.

۴. تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد(MIC) آنتی بیوتیک: MIC آنتی‌بیوتیک توسط روش میکروبراث دایلوشن در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای (Falcon, USA)تعیین شد. ابتدا رقت‌های سریالی از آنتی‌بیوتیک در محیط مولر هینتون براث تهیه شد. از کشت تازه هر سویه باکتریایی، سوسپانسیونی معادل ۰٫۵ مک فارلند تهیه و به نسبت۱:۱۰۰ رقیق شد. سپس به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون باکتریایی و ۴۰ میکرولیتر محیط کشت تلقیح شد تا حجم نهایی هر چاهک به ۱۰۰ میکرولیتر رسید. چاهک شماره ۱۱ به عنوان کنترل منفی برای کنترل آلودگی نشدن محیط و چاهک شماره ۱۲ به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. سپس میکروپلیت‌های آماده‌سازی شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد بررسی شدند. وجود کدورت دلالت بر رشد باکتری دارد و اولین چاهکی که در آن رشد مشاهده نمی‌شد به عنوان حداقل غلظت مهاری در نظر گرفته شد. آزمایش به صورت سه بار تکرار انجام شد(۱۲) .

۵ . ارزیابی واکنش سینرژیسم بین عصاره و آنتی بیوتیک برای سویه‌های استاندارد: برای ارزیابی واکنش سینرژیسم بین عصاره و آنتی‌بیوتیک روش چکربورد در براث به کار گرفته شد. ابتدا طیفی از غلظت‌ها با توجه به MIC سویه ها تعیین گ وسه،چهار غلظت بالاتر از MIC وچهار، پنج غلظت پایین‌تر از MIC برای آنتی‌بیوتیک و عصاره در نظر گرفته شد. غلظت‌های آنتی‌بیوتیک و عصاره تعیین شده در ویال‌های حاوی محیط مولر هینتون براث تهیه شد. بنابراین هفت ویال برای آنتی‌بیوتیک و هفت ویال برای عصاره آماده شد. در شرایط کاملا استریل غلظت‌های آنتی‌بیوتیک به صورت افقی و غلظت‌های عصاره به صورت عمودی در چاهک‌ها ریخته شد. از هریک از غلظت‌های آنتی‌بیوتیک و عصاره مقدار ۲۵ میکرولیتر در چاهک مربوطه ریخته شد، به طوری‌که حجم محلول در هر چاهک به ۵۰ میکرولیتر رسید. در ستون یک و ردیف هشت که به ترتیب عصاره و آنتی‌بیوتیک به صورت منفرد وجود داشت، ۲۵ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث اضافه شد تا حجم آن‌ها همانند بقیه چاهک‌ها ۵۰ میکرولیتر شود. ستون ۱۲ به عنوان کنترل مثبت و چاهک آخر ستون اول برای کنترل آلودگی نشدن محیط در نظر گرفته شد. از کشت خالص هریک از سویه‌ها کدورت نیم مک فارلند تهیه شد و در لوله‌های حاوی محیط مولر هینتون براث سوسپانسیون باکتری ۱۰۰ برابر رقیق شد.۱۰میکرولیتر از محیط مولر هینتون براث حاوی باکتری و ۴۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث در تمامی چاهک‌های میکروپلیت‌ها پخش شد. برای هر سویه باکتری یک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و پس از یک شبانه‌روز از نظر رشد باکتری بررسی شدند. کدورت شاخصی بر رشد باکتری بود. شاخص FICI برای اولین چاهکی که در آن رشد مشاهده نمی‌شد، محاسبه شد.

∑FICI=FIC (عصاره A) + FIC (سفتازیدیم:B);

FICI=MICAB/ MICA+MICAB/MICB

MIC AB: حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری در ترکیب آنتی بیوتیک و عصاره

MIC A: حداقل غلظت بازدارندگی آنتی‌بیوتیک از رشد باکتری به تنهایی

MIC B: حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری در برابر عصاره به تنهایی

بر اساس عدد حاصل از محاسبه شاخص کسری FICI ، میانکنش آنتی‌بیوتیک و عصاره به صورت زیرتفسیر شد : آثار سینرژیسم : FICI ؛ آثار افزایشی 0.5< FICI <1 ؛ بی تفاوت: 1≤FICI<4 و آثارانتوگونیسم: 4 > FICI (۱۳).

۶. ارزیابی واکنش سینرژیسم بین عصاره و آنتی‌بیوتیک برای سویه‌های بالینی: برای ارزیابی واکنش سینرژیسم بین عصاره و آنتی‌بیوتیک روش چکربورد در آگار به کار گرفته شد. از محیط مولر هینتون آگار (Himedia ,India) استفاده شد. بعد از اتوکلاو محیط مولر هینتون آگار در شرایط کاملا استریل عصاره و آنتی‌بیوتیک به محیطی که به حرارت ۵۵ درجه سانتی‌گراد رسیده بود به محیط اضافه کرده و پس از سرد شدن و اطمینان از خشک بودن سطح محیط (نبود رطوبت در سطح پلیت) استفاده شدند. از کشت خالص هریک از سویه‌ها کدورت نیم مک فارلند تهیه و باکتری در سرم فیزیولوژی استریل ۱۰۰ برابر رقیق شد. تلقیح سویه‌های باکتری با استفاده از hand inoculator(Mast Chemical Company ,England) انجام شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و پس از یک شبانه‌روز از نظر رشد باکتری بررسی شدند. شاخص FICI برای پلیت‌هایی که در آن رشد مشاهده نمی‌شد، محاسبه شد.

یافته‌ها:

حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد(MIC) عصاره‌ها به روش رقت در آگار

در این مطالعه غلظت‌های دوهزار و یکهزار و۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌ها بر سویه‌های استاندارد پسودوموناس آئروژینوزا به کار گرفته شد. از بین ۵۷ عصاره آبی، اتانولی و متانولی ۱۹ گیاه بررسی شده، عصاره متانولی و اتانولی مازو دارای بیشترین اثر ضدمیکروبی روی سویه‌های مطالعه شده بود. در این مطالعه بعد از تعیین MIC به روش رقت در آگار مشخص شد که عصاره متانولی و اتانولی مازو در غلظت µg /ml1000، قادر به مهار رشد تمام سویه‌های استاندارد و بالینی پسودوموناس آئروژینوزا است. به طوری که MIC عصاره متانولی و اتانولی مازو برای تمام ایزوله‌ها هزار میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. عصاره آبی مازو و عصاره متانولی و اتانولی مورد و اکالیپتوس نیز در غلظت‌های هزار و دوهزار میکروگرم بر میلی‌لیتر سبب کاهش رشد باکتری در سطح محیط گشت در مقایسه با کنترل شدند، ولی رشد نیافتگی دیده نشد.

حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد(MIC) آنتی بیوتیک سفتازیدیم

حداقل غلظت مهارکننده از رشد آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم برای سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. نتایج حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد(MIC) آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم علیه سویه‌های استاندارد بین یک تا چهار میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که نشان‌دهنده حساسیت تمامی سویه‌های استاندارد نسبت به آنتی‌بیوتیک مزبور بود، در حالی که میزان MIC90 و MIC50 و میانگین MIC نسبت به سفتازیدیم در ایزوله‌های بالینی به ترتیب برابر با ۱۰۲۴ و ۵۱۲ و ۶۹۴/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

واکنش سینرژیسم بین عصاره و آنتی‌بیوتیک در سویه‌های استاندارد

برای بررسی میانکنش بین آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم و عصاره مازو علیه سویه‌های استاندارد پسودوموناس آئروژینوزا ، روش Checker Board در براث به کار گرفته شد. پس از ترکیب کردن آنتی بیوتیک‌ها و عصاره در غلظت‌های انتخابی میزان FICI محاسبه و تفسیر شد. نتیجه این مطالعه نبود واکنش سینرژیسم بین آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم و عصاره متانولی مازو بود. در این مطالعه چهار سویه استاندارد واکنش بی‌تفاوتی را نشان دادند اما در سویه MS.PS ۳۰/۵۰ که حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد بالاتر از سایر ایزوله (چهارمیکروگرم بر میلی لیتر) واکنش افزایشی مشاهده شد.

واکنش سینرژیسم بین عصاره و آنتی بیوتیک در سویه های بالینی

برای بررسی میانکنش بین آنتی بیوتیک سفتازیدیم و غلظت های Sub MIC

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 21:52 +0430 on Monday September 16th 2019

عصاره متانولی مازو علیه سویه های بالینی پسودوموناس آئروژینوزای بررسی شده از روش رقت در آگار استفاده شد. پس از ترکیب کردن آنتی‌بیوتیک‌ها و عصاره در غلظت‌های انتخابی میزان FICI برای سویه‌های بررسی شده محاسبه و تفسیر شد. بررسی نشان داد که ترکیب غلظت‌های ۵۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی مازو و غلظت‌های۱۶ و هشت وچهار میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک سفتازیدم واکنش سینرژیسم وجود دارد اما در غلظت‌های ۱۲۵ و ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره مازو هیچ واکنش سینرژیسمی مشاهده نشد(جدول شماره۲).

جدول ۲ : میزان FIC برای انتی بیوتیک سفتازیدیم و عصاره مازو و FICI در ترکیب آنتی بیوتیک سفتازیدیم و عصاره متانولی مازو در سویه های استاندارد و بالینی پسودوموناس آئروژینوز. در تمام موارد FICI بوده و میانکنش بین آنتی‌بیوتیک و سفتازیدیم سینرژیسم است.

شماره ایزوله‌ها	FICآنتی بیوتیک	FICعصاره	FICI
۱	۰/۰۱۵	۰/۲۵	۰/۲۶
۲	۰/۰۱۵	۰/۲۵	۰/۲۶
۳	۰/۰۱۵	۰/۲۵	۰/۲۶
۴	۰/۰۱۵	۰/۲۵	۰/۲۶
۵	۰/۰۱۵	۰/۲۵	۰/۲۶
۶	۰/۰۰۸	۰/۲۵	۰/۲۵
۷	۰/۰۰۸	۰/۲۵	۰/۲۵
۸	۰/۰۰۸	۰/۲۵	۰/۲۵
۹	۰/۰۰۸	۰/۲۵	۰/۲۵
۱۰	۰/۰۰۸	۰/۲۵	۰/۲۵
۱۱	۰/۰۰۸	۰/۲۵	۰/۲۵
۱۲	۰/۰۰۴	۰/۲۵	۰/۲۵
۱۳	۰/۰۰۱	۰/۲۵	۰/۲۵
۱۴	۰/۰۰۸	۰/۲۵	۰/۲۵
۱۵	۰/۰۰۴	۰/۲۵	۰/۲۵
۱۶	۰/۰۰۴	۰/۲۵	۰/۲۵
۱۷	۰/۰۶۲	۰/۲۵	۰/۳۱
۱۸	۰/۰۰۸	۰/۲۵	۰/۲۵
۱۹	۰/۰۰۴	۰/۲۵	۰/۲۵
۲۰	۰/۰۱۵	۰/۲۵	۰/۲۶

بحث:

امروزه پسودوموناس آئروژینوزا نقش مهمی را در عفونت‌های بیمارستانی ایفا می‌کند و به دلیل مقاومت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها عفونت به وسیله آن به عنوان یک مشکل شناخته می‌شود. در مطالعه‌های متعددی نشان داده شده که عصاره های متانولی گیاهان دارای آثار مهارکنندگی بیشتری نسبت به عصاره های دیگر هستند. به دلیل اینکه اجزای فعال قسمت های گیاه با متانول در مقایسه با حلال‌های دیگر مانند آب وپترولیوم اترحلال‌های بهتر هستند(۱۴،۱۵،۱۶،۱۷). در مطالعه شریفی‌فر و همکاران نشان داده شد عصاره اتانولی برگ‌های مازو فعالیت ضد میکروبی بیشتری در مقایسه با عصاره آبی آن دارد که شاید به دلیل ترکیب‌های آلی متنوعی است که می‌توانند بیشتر در این قبیل حلال‌ها از صافی عبور کنند(۱۸).

نتایج این یافته ها با مطالعه ما مطابقت دارد و در مطالعه ما نیز بازدهی عصاره های متانولی و اتانولی در مقایسه با عصاره های آبی بیشتر بود و همچنین عصاره های متانولی و اتانولی اثر ضد میکروبی بهتری در مقایسه با عصاره های آبی داشتند. Veeramuthu و همکاران فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی و هگزانی ۱۸ گیاه دارویی را علیه سویه‌های باکتریایی باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمیدیس، پسودوموناس آئروژینوزا، انتروکوک فکالیس، اشریشیا کلی،کلبسیلا پنومونیه و پروتئوس ولگاریس بررسی کردند که از بین این ۱۸ گیاه، ۱۰ گیاه فعالیت ضد میکروبی خوبی را علیه این باکتری‌ها نشان دادند(۱۹). نتایج مطالعه ما نشان داد از بین ۱۹ گیاه دارویی شامل عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی بررسی شده در این طرح عصاره متانولی و اتانولی مازو دارای بیشترین اثر ضد میکروبی روی سویه‌های بالینی و استاندارد پسودوموناس آئروژینوزا بودند و در غلظت ۲هزار و هزار میکروگرم بر میلی‌لیتر از رشد تمامی باکتری‌های بررسی شده جلوگیری کردند. به طوری که MIC عصاره متانولی و اتانولی مازو برای تمام ایزوله ها هزار میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. عصاره آبی مازو و عصاره متانولی و اتانولی مورد و اکالیپتوس نیز در این دو غلظت سبب کاهش رشد باکتری شده، ولی ممانعت کامل از رشد دیده نشد. مازو با نام علمی Quercus infectoria جزو گیاهان تیره Fagaceae است. Quercus infectoria درخت کوچکی است که در بسیاری از نقاط دنیا از جمله یونان، آسیای میانه، سوریه و ایران رشد می‌کند(۲۰). گال‌هایی که روی شاخه‌های جوان این درخت به‌وجود می‌آیند، در نتیجه حمله زنبور هستند. گال‌های مازو برای قرن‌ها در داروهای سنتی شرقی برای درمان بیماری‌های التهابی استفاده می‌شد و از نظر فارماکولوژیکی ثابت شده که دارای اثر ضد درد، ضد ترومورین، بیهوشی موضعی، ضد ویروسی، ضد باکتریایی و ضد قارچی هستند و فعالیت ضد التهابی دارند(۲۱). در ترکیب‌های مازو ۵۰ تا ۷۰ درصد تانن و مقدار کمی اسید گالیک و اسید الاجیک وجود داشته و به نظر می‌رسد خصوصیات ضد میکروبی گال‌های مازو به دلیل مقدار بالای تانن موجود در آن‌هاست(۲۳،۲۲). مطالعه‌های زیادی نشان داده‌اند که عصاره‌های گیاهی علیه باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی فعالیت دارند. دلیل اصلی این تفاوت در حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در برابر عصاره گیاهان می‌تواند به دلیل غشای خارجی احاطه‌کننده دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی باشد که مانع انتشار ترکیب‌ها از طریق پوشش لیپوپلی ساکارید می‌شود. همچنین فضای پری پلاسمیک حاوی آنزی‌هایی است که قادر به شکستن مولکول‌هایی هستند که از خارج وارد می‌شوند(۲۴،۲۳) .در مطالعه ما نیز بیشتر عصاره‌ها بر روی پسودوموناس آئروژینوزا که یک باکتری گرم منفی است اثر ضد میکروبی اندکی داشتند در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۱ Kashi و همکاران تایید کردند که تفاوت در فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها می‌تواند به خاطر تفاوت در ترکیب شیمیایی آن‌ها باشد. زمان جمع‌آوری نمونه‌ها، نمونه‌های جمع‌آوری شده از نواحی جغرافیایی متفاوت با اقلیم و پوشش گیاهی متفاوت، فعالیت ضد میکروبی متفاوتی را نیز از خود نشان می‌دهند(۲۵). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ بر روی گال‌های مازو و ایزوله های باکتریایی جدا شده از عفونت های سوختگی انجام شد، نشان داده شد که تفاوت در نتایج بررسی آثار مازو با مطالعه‌های دیگر به دلیل تفاوت در نوع گال‌ها، متد عصاره‌گیری و فرآیند خشک شدن عصاره‌هاست(۲۲). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۰ Adwan و همکاران فعالیت ضد میکروبی تعدادی عصاره گیاهی را به تنهایی و در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های اکسی تتراسایکلین، انروفلوکساسین و جنتامایسین علیه سویه‌های MDR پسودوموناس آئروژینوزا بررسی کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره اتانولی گیاه Rhus coriaria فعالیت ضد میکروبی بیشتری را بر سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا به تنهایی و در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌ها دارد(۲۶). در مطالعه ما نیز اثر سینرژیسمی بین آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم و عصاره متانولی و اتانولی مازو علیه سویه‌های استاندارد و بالینی پسودوموناس آئروژینوزا به روش چکربورد۲ در براث مشاهده نشد. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۰ Bag و همکاران، آثار سینرژیسم عصاره گیاه Terminilia chebula و آنتی بیوتیک های آموکسی سیلین، سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و توبرامایسین را علیه هشت

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 21:52 +0430 on Monday September 16th 2019

ایزوله E-coli یوروپاتوژنیک به روش چکربورد در براث بررسی کردند. از بین پنج آنتی‌بیوتیک بررسی شده، آثارسینرژیسم قوی در ترکیب عصاره گیاه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و توبرامایسین مشاهده کردند(۲۷). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ توسط Basri و همکاران اثر ضد میکروبی عصاره متانولی و استونی مازو بر سویه‌های استافیلوکوک‌های ارئوس مقاوم به متی‌سیلین MRSA و اثر سینرژیسم آن را با آنتی‌بیوتیک ونکومایسین بررسی کردند. نتایج نشان داد که MIC عصاره متانولی مازو برای سویه ATCC 33591 برابربا ۰/625 mg/ml و برای عصاره استونی 312/0 mg/mlبود. MIC برای هر دو عصاره روی سویه MRSA MU945 برابر با ۰/312 mg/mlبود و نتایج بررسی سینرژیسم با آنتی بیوتیک ونکومایسین نشان داد که عصاره متانولی هشت برابر و عصاره استونی ۱۶ برابر میزان MIC را کاهش دادند که نشان‌دهنده این است که این عصاره می‌تواند در ترکیب با آنتی‌بیوتیک ونکومایسین ساخت دیواره سلولی را مهار کند(۲۸). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹ توسط Chusri و همکاران روی سویه‌های بالینی MRSA استافیلوکوک اورئوس انجام شد، مشاهده شد که عصاره اتانولی مازو دارای توانایی مهار ایزوله‌های MRSA است. در این مطالعه اکثر سویه‌های بالینی، فعالیت سینرژیسمی بین عصاره اتانولی مازو و آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی سیلین، اگزاسیلین و پنی‌سیلین G نشان دادند(۲۹). در سال ۲۰۰۹، Abu-Hijleh و همکاران واکنش سینرژیسم بین عصاره اتانولی Varthemia iphionoitks و آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم در محیط آگار علیه سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوک اورئوس نشان دادند. در حالی که در سویه‌های استافیلوکوک اپیدرمیدیس و اشریشیا کلی واکنش آنتاگونیسم وجود داشت(۳۰). در مطالعه ما اثر سینرژیسمی بین آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم و عصاره متانولی مازو روی سویه‌های بالینی تنها با روش رقت در آگار مشاهده شد که دلیل آن نبود حلالیت کامل عصاره در براث یا رسوب عصاره است که مانع واکنش ضد میکروبی می‌شود. میزان MIC50 برای ایزوله‌های بالینی برابر با 512 µg /ml و MIC90 برابر با 1024 µg /ml بود که نشان‌دهنده این است میزان مقاومت به سفتازیدیم خیلی بالا بود. این بررسی دارای نتایج قابل ملاحظه ای است؛ زیرا MIC عصاره گیاهی و آنتی بیوتیک سفتازیدیم به شدت کاهش یافته بود. برای مثال؛ در نمونه‌های بالینی MIC نسبت به سفتازیدیم بسیار بالا بود، ولی در مجاورت با عصاره متانولی مازو تمامی MICها به میزان بسیار زیاد کاهش یافته بودند. در نتیجه ترکیب‌های موجود در گیاه مازو و ترکیب‌های موثره این گیاه که سبب کاهش MIC می‌شود نیاز به بررسی بیشتر داشته و دارویی مانند سفتازیدیم می‌تواند با دوز بسیار کمتر استفاده شود.

نتیجه‌گیری:

نتایج این مطالعه نشان دهنده این است که عصاره های گیاهی دارای مواد ضدمیکروبی مناسبی است که می‌توان از آن‌ها به عنوان یک پایه دارویی یا یک داروی گیاهی مناسب برای مبارزه با میکروارگانیسم‌هایی از جمله پسودوموناس آئروژینوزا استفاده کرد. در این مطالعه نشان داده شد که عصاره متانولی و اتانولی مازو دارای فعالیت ضد میکروبی خوبی روی پسودوموناس آئروژینوزاست و آثار سینرژیسم قابل ملاحظه‌ای با سفتازیدیم دارد.

منابع:

1. Owlia P, Saderi H, Rasooli I, Sefidkon F. Antimicrobial characteristics of some herbal oils on Pseudomonas aeruginosa with special reference to their chemical compositions. Iranian journal of pharmaceutical research. 2009;8(2):107–14.

2. Strateva T, Yordanov D. Pseudomonas aeruginosa - A phenomenon of bacterial resistance. Journal of medical microbiology. 2009;58(9):1133–48.

3. Musthafa KS, Saroja V, Pandian SK, Ravi AV. Antipathogenic potential of marine Bacillus sp. SS4 on N-acyl-homoserine- lactone-mediated virulence factors production in Pseudomonas aeruginosa (PAO1). Journal of biosciences. 2011;36(1):55–67.

4. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of Pseudomonas aeruginosa to antimicrobials. Frontiers in microbiology. 2014;4(1):1–8.

5. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Primary mechanisms mediating aminoglycoside resistance in the multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa clinical isolate PA7. Microbiology. 2018;1(2012):1071–83.

6. Nenaah EG, Ahmed ME. Antimicrobial activity of extracts and latex of Calotropis procera (Ait.) and synergistic effect with reference antimicrobials. Research Journal of Medicinal plants. 2011;5(6):706–16.

7. Mahmoudi E, Tarzaban S, Abed A. Acyl homoserin lactone mimic compounds from plants excite quorum sensing related behaviors in Chromobacterium violaceum CV026 and Pectobacterium carotovorum. International journal of soil Forest and erosin 2013 ;3 (4):141–5.

8. Adwan G, Abu-shanab B, Adwan K. In vitro activity of certain drugs in combination with plant extracts against Staphylococcus aureus infections. African journal of biotechnology. 2009;8(17):4239–41.

9. Wang W, Wu N, Zu YG, Fu YJ. Antioxidative activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil compared to its main components. Food chemistry. 2008;108(3):1019–22.

10. Mehrotra V, Mehrotra S, Kirar V, Shyam R, Misra K, Srivastava AK,. Antioxidant and antimicrobial activities of aqueous extract of Withania somnifera against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Journal of microbiology and biotechnology research. 2017;1(1):40–5.

11. Mahboubi A, Kamalinejad M,Ayotllahi AM, Babaeian M. Total phenolic content and antibacterial activity of five plants of Labiatae against four foodborne and some other bacteria. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR, 2014; 13(2): 559-66.

12. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2001;48(suppl_1):5–16.

13. Olajuyigbe OO, Afolayan AJ. Synergistic interactions of methanolic extract of Acacia mearnsii De Wild. with antibiotics against bacteria of clinical relevance. International journal of molecular sciences. 2012;13(7):8915–32.

14. Natheer SE, Sekar C, Amutharaj P, Rahman MSA, Khan KF. Evaluation of antibacterial activity of Morinda citrifolia, Vitex trifolia and Chromolaena odorata. African journal of pharmacy and pharmacology. 2012;6(11):783–8.

15. Ahmad W, Zeenat F, Hasan A, Abdullah A, Nargis A, Tarannum T. Mazu (Quercus infectoria, Oliv)-An Overview. Indian J Unani Med. 2011;4(1):17–22.

16. Alo MN, Anyim C, Igwe JC, Elom M, Uchenna DS. Antibacterial activity of water, ethanol and methanol extracts of Ocimum gratissimum, Vernonia amygdalina and Aframomum melegueta. Advances in Applied Science Research. 2012;3(2):844–8.

17. El-Zawahry YA, Reda FM, Azazy WM. Synergistic effect of

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 21:52 +0430 on Monday September 16th 2019

combination treatment by certain plant extracts and some antibiotics on the resistance of pathogenic bacteria to some common antibiotics. Life science journal. 2013;10(4):3477–89.

18. Shariatifar N, Fathabad AE, Khaniki GJ, Nasrabadi HG. Evaluation of the antibacterial activity of essential oil and aqueous and ethanolic extracts of Quercus infectoria leaves on food-borne pathogenic bacteria. International journal of pharmaceutical sciences and research. 2014;5(10):709–13.

19. Duraipandiyan V, Ayyanar M, Ignacimuthu S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. BioMed Central Complementary and alternative medicine. 2006;1472-6882/6/35.

20. Kaur G, Hamid H, Ali A, Alam MS, Athar M. Antiinflammatory evaluation of alcoholic extract of galls of Quercus infectoria. Journal of ethnopharmacology. 2004;90(2–3):285–92.

21. Umachigi SP, Jayaveera KN, Kumar CKA, Kumar GS, Kumar DVK. Studies on wound healing properties of Quercus infectoria. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2008;7(1):913–9.

22. Karbasizade V, Sichani MM, Chaharmiri S. High antibacterial activity of different extracts of Ghalghaf and Mazouj galls against bacterial isolates from burn infections. Indian journal of scientific research. 2014;2(1):315–23.

23. Vermani A. Screening of Quercus infectoria gall extracts as anti-bacterial agents against dental pathogens. Indian journal of dental research. 2009;20(3):337-9.

24. Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Možina SS. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. Journal of microbiological methods. 2010;81(2):121–6.

25. Kashi TSJ, Kermanshahi RK, Erfan M, Dastjerdi EV, Rezaei Y, Tabatabaei FS. Evaluating the in-vitro antibacterial effect of Iranian propolis on oral microorganisms. Iranian journal of pharmaceutical research. 2011;10(2):363-8.

26. Adwan G, Abu-Shanab B, Adwan K. Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug–resistant Pseudomonas aeruginosa strains. Asian Pacific journal of tropical medicine. 2010;3(4):266–9.

27. Bag A, Bhattacharyya SK, Pal NK, Chattopadhyay RR. Synergistic Effect of Terminalia chebula and Antibiotics against Multidrug-resistant Uropathogenic Escherichia coli. Medicinal and aromatic plant science and biotechnology. 2010;5(1):70–3.

28. Basri DF, Khairon R. Pharmacodynamic interaction of Quercus infectoria galls extract in combination with vancomycin against MRSA using microdilution checkerboard and time-kill assay. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012;2012(1):1–6.

29. Chusri S, Voravuthikunchai SP. Detailed studies on Quercus infectoria Olivier (nutgalls) as an alternative treatment for methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. Journal of Applied Microbiology. 2009;106(1):89–96.

30. Abu-Hijleh A, Jarrar N, Adwan K. Antibacterial activity of common Varthemia, Varthemia iphionoides ethanol extract alone and in combination with cefotaxine. Advances in Biological Research. 2009;3(1):144–7.