فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۵، شمارهٔ ۳، صفحهٔ ۳۹۷-۳۸٦ (۱۳۸۸)

اثر ضد میکروبی عصاره *Terminalia Catappa* L. بر باکتریهای جدا شده از عفونت زخم سوختگی و مقایسه آن با اثر آنتی‌بیوتیکهای منتخب

محمدمهدی عطارپور یزدی[1*]، محمد کمالی‌نژاد[2]، نسیم‌سادات فلوایی‌کوچک[3] و صادق منصوری[4]

۱*- نویسنده مسئول، مربی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد
پست الکترونیک: mmayazdi@yahoo.com و attarpouryazdi@shahed.ac.ir
۲- مربی گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه شهید بهشتی
۳- دانش‌آموخته رشته دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی
٤-کارشناس، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۸۷ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۸۸

چکیده

زخم سوختگی محل مناسبی برای بروز عفونتهای مقاوم به درمان می‌باشد. بنابراین تحقیق در زمینه بدست آوردن داروهای مؤثر بر باکتریهای مولد این عفونت ضروری به نظر می‌رسد. هدف از انجام این مطالعه، شناسایی اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی میوه گیاه گارم زنگی (*Terminalia Catappa* L.) بر باکتریهای جدا شده از عفونت زخم سوختگی و مقایسه آن با اثر آنتی‌بیوتیکهای منتخب برای هر باکتری بود. ابتدا عصاره متانولی میوه این گیاه تهیه شد و بعد فعالیت ضد باکتریایی آن بر علیه ۸ نوع باکتری جدا شده از عفونت زخم سوختگی ۱۰۰ بیمار ابتدا به روش انتشار در آگار (چاهک) در غلظت ٤۰mg/ml و بعد رقت‌های متوالی در آگار در رقت‌های ۲۰mg/ml-۰/۰۳۹ بررسی شد و MIC (Minimal Inhibitory Concentration) گیاه برای انواع حساس تعیین شد. اثر آنتی‌بیوتیکهای منتخب بر باکتریها نیز به روش دیسک بررسی شد. برای مقایسه اثر عصاره و آنتی‌بیوتیکها از آزمون Onava تک متغیره استفاده شد. نتایج بدست آمده از آزمایشها نشان داد که عصاره متانولی یاد شده، بر علیه ۱۰۰٪ از *Pseudomonas aeruginosa* و *Acinetobacter* spp.، بیش از ۸۰٪ از سه گونه *Staphylococcus* و ۵۰٪ از *Escherichia coli* بدست آمده از نمونه‌های بالینی با MIC=20mg/ml مؤثر است. این در حالی است که بیشتر نمونه‌ها به آنتی‌بیوتیکها مقاوم بودند. تفاوت اثر آنتی‌بیوتیک و گیاه برای *Pseudomonas aeruginosa* (P<0/001)، *Acinetobacter* spp. (P<0/05) و انواع *Staphylococcus* (P<0/05) معنی‌دار بود. این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره متانولی *Terminalia Catappa* اثر ضد باکتریایی بسیار خوبی بر علیه اغلب باکتریهای مولد عفونت زخم سوختگی دارد. بنابراین می‌توان این عصاره را پس از مطالعاتی با طیف وسیعتر به صورت آزمایشگاهی و بالینی، به‌عنوان یک داروی ضد باکتریایی مورد توجه قرار داد.

واژه‌های کلیدی: *Terminalia Catappa* L.، عفونت زخم سوختگی، عصاره متانولی، ضد باکتریایی.

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

سوختگی، جراحتی است که در آن پوست به‌وسیله عوامل گوناگون ازجمله: حرارت، سرما، الکتریسیته و ... تخریب می‌شود (Brunicardia *et al*., 2005). در اغلب موارد، علاوه بر تخریب پوست، اختلالات سیستمیک نیز در بدن بوجود می‌آید (Brunicardia *et al*., 2005). ضایعه سوختگی باعث می‌شود تا پوست که به‌عنوان سد دفاعی بدن در مقابل ورود میکروبهاست از بین رود و سیستم ایمنی فرد دچار نقص شود (Unhwan & Shouguang, 1999). این وضعیت سبب می‌شود که بیماران دچار سوختگی، در معرض عفونتهای ناشی از باکتریهای مختلف قرار گیرند (Unhwan & Shouguang, 1999).

زخم سوختگی، محل مناسبی برای بروز عفونت است. بنابراین، عفونت زخم در این بیماران مکرراً رخ داده و یکی از دلایل مهم مرگ و میر آنها می‌باشد (Miri *et al*., 2005؛ Dale *et al*., 2004؛ Cakir & Yegen, 2004؛ Wonkeum *et al*., 2001). همچنین می‌توان گفت عفونت مهمترین عاملی است که باعث می‌شود زخم دیر بهبود یابد و مدت درمان طولانی شود (Miri *et al*., 2005). این عفونت هم به‌وسیله باکتریهای گرم مثبت و هم گرم منفی ایجاد می‌شود (Dale *et al*., 2004).

در دهه‌های اخیر، مقاومت به داروهای ضد میکروبی در باکتریهای ایجادکننده عفونت زخم سوختگی رو به افزایش است (Wonkeum *et al*., 2001). به‌طوری که حدود ٪۷۵ از موارد مرگ و میر را در بر می‌گیرد (Cakir & Yegen, 2004). باید دانست، باکتریهایی که باعث عفونت زخم سوختگی می‌شوند، نسبت به همان نوع از باکتریها در بیماریهای دیگر، مقاومت بیشتری به داروهای ضد میکروبی نشان می‌دهند (Babayi *et al*., 2004). با توجه به این موارد، تحقیق و پژوهش در زمینه‌های مختلف ازجمله: بیوتکنولوژی، فارماکوگنوزی، شیمی دارویی و ... در جهت کشف و تولید داروهای جدید و مؤثر بر عفونت سوختگی حائز اهمیت است.

در این تحقیق، اثر عصاره متانولی میوه گیاه *Terminalia catappa* بر باکتریهای جدا شده از زخم سوختگی بررسی شد. در ابتدا، یک مطالعه اولیه به منظور بررسی اثر ضد باکتری گارم زنگی بر روی چندین سوش استاندارد میکروبی که اغلب باعث عفونت زخم سوختگی می‌شوند، انجام شد. نتیجه، نشان‌دهنده اثر ضد باکتری آن بود. بعد اثر این گیاه بر روی نمونه‌های بالینی آزمایش شد.

Terminalia catappa، با نام فارسی گارم زنگی به خانواده Combretaceae (بادام هندی) تعلق دارد. این گیاه به‌طور وسیعی در مناطق گرم جهان ازجمله کشورهای آسیایی شرقی می‌روید (زرگری، ۱۳٦۷؛ مظفریان، ۱۳۸۳)، گیاه یاد شده بومی کشورهایی ازجمله هند، مالزی، کامرون و ماداگاسکار است (زرگری، ۱۳٦۷؛ مظفریان، ۱۳۸۳؛ Noumi & Yomi, 2001). گارم زنگی، درختی بلند به ارتفاع ۲۵ متر با شاخه‌های افقی است (زرگری، ۱۳٦۷). میوه آن تخم‌مرغی شکل و پهن است و ۵ سانتی‌متر طول دارد (مظفریان، ۱۳۸۳). رنگ آن سبز یا قرمز می‌باشد و دو گوشه بالدار دارد؛ طعم میوه بین تلخ و شیرین بوده و حالت گس دارد (زرگری، ۱۳٦۷)؛ از برگ و پوست تنه این درخت، اثر ضد باکتری گزارش شده است (Ray *et al*., 2004؛ Prajapati *et al*., 2003؛ Duke *et al*., 2002؛ Babayi *et al*., 2004؛ Adam, 2003).

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روشها

نمونه‌برداری و تعیین هویت میکروبی

در ابتدا، از عفونت زخم صد بیمار دچار جراحت سوختگی که در بیمارستان سوانح و سوختگی شهید مطهری تهران بستری بودند، به مرور زمان به‌صورت تصادفی به مدت یازده ماه نمونه‌برداری انجام شد و در هر مورد، نمونه‌ها به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل شده، بعد از تهیه کشت خالص با انجام آزمایشهای مستقیم و تستهای بیوشیمیایی لازم (Forbes *et al.*, 2007؛ Mahon *et al.*, 2007) نسبت به شناسایی و تعیین هویت آنها اقدام شد.

عصاره‌گیری

Terminlia catappa در جنوب ایران می‌روید. میوه گیاه مزبور خوراکی است و اواخر خردادماه کاملاً رسیده می‌شود. میوه این گیاه در اواخر خردادماه از بندرعباس جمع‌آوری شده و پس از انتقال به تهران در آزمایشگاه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی شهید بهشتی مورد شناسایی قرار گرفت. لازم به تذکر است که *Terminalia catappa* با شماره هرباریومی ۱۵۸۰ در هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی به ثبت رسیده است. قسمت اپی‌کارپ و مزوکارپ میوه‌ها جدا شده و برای عصاره‌گیری استفاده شد. روش عصاره‌گیری، ماسراسیون و با استفاده از حلال متانول مرک خالص و مدت زمان انجام این کار ۴۸ ساعت بود. عمل عصاره‌گیری ۳ بار انجام شد و در طول این مدت از همزن مغناطیسی به تناوب استفاده گردید. برای تبخیر حلال و تغلیظ عصاره از دستگاه Rotary evaporator استفاده شد. بدین ترتیب از هر ۱۰۰گرم ماده گیاهی، حدود ٦ گرم عصاره نیمه جامد بدست آمد.

آزمایشهای تعیین حساسیت میکروبی

همان طور که در بخش مقدمه به آن اشاره شد، برای بررسی اثر ضد میکروبی گارم زنگی، در ابتدا یک مطالعه اولیه بر روی سوش‌های استاندارد میکروبی که باعث عفونت زخم سوختگی می‌شوند انجام شد تا در صورت مؤثر بودن، اثربخشی آن بر نمونه‌های بالینی بررسی شود. سوش‌های استاندارد بکار رفته عبارت بودند از:

Staphylococcus epidermidis (PTCC 1114)
Staphylococcus aureus (ATCC 25923)
Staphylococcus saprophyticus (PTCC1440)
klebsiella pneumoniae (ATCC 700603)
*Escherichia coli (*ATCC 25922)
Enterobacter aerogenes (PTCC 1221)
Acinetobacter baumannii (PTCC 1318)
Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)

کلیه میکروارگانیسمها از مرکز پژوهشگاه علمی و صنعتی ایران تهیه شدند (جدول ۱).

برای بررسی حساسیت نمونه‌های استاندارد به عصاره و همچنین مطالعه اولیه بر روی نمونه‌های بالینی تعیین هویت شده از روش انتشار در آگار با ایجاد چاهک (well diffusion) در محیط مولر هینتون استفاده شد. غلظت بکار رفته از عصاره در این مرحله ٤٠mg/ml بود. بعد برای نمونه‌های بالینی که در این غلظت، هاله عدم رشد داشتند از روش رقت در آگار استفاده شد تا ضمن بررسی اثربخشی عصاره بر نمونه‌ها در رقت‌های پایین‌تر از ٤٠mg/ml، MIC (Minimal Inhibitory Concentration) عصاره نیز برای انواع حساس بدست آید. در هر دو روش از آب مقطر استریل به‌عنوان حلال استفاده و نتایج بعد از ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری بررسی شد.

Archive of SID

www.SID.ir

در روش انتشار در آگار (چاهک) ابتدا حفره‌ای توسط پیپت پاستور در محیط مولر هینتون به قطر ٦mm ایجاد شد و پس از کشت سویه مورد نظر روی آن، ۵۰µl از محلول عصاره با غلظت ٤٠mg/ml که قبلاً تهیه شده بود درون حفره ریخته و بعد از ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری، قطر هاله عدم رشد میکروبی بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

برای بررسی اثر عصاره در رقت‌های پایین‌تر از ٤٠mg/ml و همچنین تعیین MIC، با توجه به زیاد بودن نمونه‌ها، از روش رقت‌های متوالی در آگار (Agar serial Dilution) (Forbes *et al*., 2007) استفاده شد. در این روش ابتدا رقت‌های مختلفی از عصاره به‌ترتیب ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/٦۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵٦، ۰/۰۷۸ و ۰/۰۳۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد و بعد با محیط کشت مناسب مخلوط شد و درون پلیت قرار گرفت. همچنین یک پلیت نیز که محتوی محیط کشت خالص بود به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. بعد از هر سویه میکروبی به مقدار $(\frac{CFU}{spot})^{5}$۱۰ به روی یازده پلیت تلقیح شد. پس از ٢٤ ساعت انکوباتورگذاری، نتایج با توجه به رشد یا عدم رشد هر سویه میکروبی در رقت‌های مختلف، ثبت شدند.

در مرحله آخر فعالیت ضد میکروبی آنتی‌بیوتیکهای منتخب (Kasper *et al*., 2005) شامل پنی‌سیلین، اگزاسیلین، وانکومایسین، سفتازیدیم، توبرامایسین، ایمی‌پنم و آمیکاسین به روش انتشار در آگار با استفاده از دیسک (Kirby- Bauer Disk Diffusion) بر روی سویه‌های میکروبی مورد نظر بررسی و ثبت شد. کلیه دیسک‌ها از شرکت MAST بودند.

در نهایت به مقایسه فعالیت ضد میکروبی عصاره مورد آزمایش با آنتی‌بیوتیکهای منتخب بر روی سویه‌های میکروبی جدا شده بالینی پرداخته شد.

نوع مطالعه و روشهای آماری

این پژوهش یک تحقیق توصیفی- تحلیلی از نوع غیر مداخله‌ای، غیر هم‌گروهی و مقطعی می‌باشد. به منظور بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکها و عصاره بر باکتریهای مورد مطالعه از آزمون Anova تک متغیره با کاربرد برنامه‌های آماری رایانه‌ای SPSS و SAS استفاده شد. لازم به تذکر است که هر مرحله از آزمایش ۳ بار تکرار شد.

نتایج

از عفونت زخم صد بیمار دچار جراحت سوختگی، انواع مختلفی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی بدست آمدند (جدول ۲) که عبارت بودند از:

Acinetobacter spp.، *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus*، *Staphylococcus epidermidis*، *klebsiella* spp.، *Escherichia coli*، *Enterobacter* spp. و *Staphylococcus saprophyticus*.

درصد بروز گونه *Pseudomonas aeruginosa* از همه بیشتر بود. به‌طوری که ٤١٪ (٤١ نفر) از بیماران در زخم خود این باکتری را داشتند. *Acinetobacter* spp. از این نظر در رتبهٔ دوم ۳۰٪ (۳۰ نفر) و *Staphylococcus aureus* در رتبه سوم ٢٦٪ (٢٦ نفر) قرار داشتند. درصد بروز باکتریهای خانواده انتروباکتریاسیه ناچیز بود. به‌طوری که میزان بروز *Escherichia coli* ٦٪ (٦ نفر)، *Klebsiella* spp. ۹٪ (۹ نفر) و *Enterobacter* spp. ۳٪ (۳ نفر) بود. کمترین درصد بروز مربوط به *Enterobacter* spp. ۳٪

Archive of SID
www.SID.ir

(۳ نفـر) و بعـد *Staphylococcus saprophyticus* ۱٪ (۱نفر) بود. همچنـین بـسیاری از بیمـاران در زخـم خـود عفونت توأم داشتند (جدول ۲).

در بررسی اثر عصاره به روش چاهک در غلظت ٤٠mg/ml بر سوش‌های استاندارد و نمونه‌های بالینی، هاله مهار رشد برای همه نمونه‌ها دیده شد. در مورد سوش‌های استاندارد، بیشترین هاله مهار رشد مربوط به *Pseudomonas* (۳۵mm)، *Acinetobacter* (۳۳mm) و انواع *Staphylococcus* (۲۷mm) بود. در مورد نمونه‌های بالینی هم وضعیت به همین صورت بود. به‌طوری که میانگین قطر هاله مهار رشد برای *Pseudomonas aeruginosa* برابر با ۲٦/۹٥mm، *Acinetobacter* spp. برابر با ۲٦/۷mm و انواع *Staphylococcus* برابر با ۲۰/٦mm بود (جدول ۱).

در بررسی اثـر *Terminalia catappa* بـر نمونـه‌هـای بالینی به روش رقت در آگـار در رقـت‌هـای پـایین‌تـر از ٤٠mg/ml، مشاهده شد که عـصاره در غلظـت ۲۰mg/ml از رشـد همـه انـواع *Pseudomonas aeruginosa* و *Acinetobacter* spp.، ۲۲ مـورد (۸٤/٦٪) از انـواع *Staphylococcus aureus* و ۹ مـورد (۸۱/۸٪) از انـواع *Staphylococcus epidermidis* جلوگیری می‌کند. از انواع *Staphylococcus saprophyticus* تنها یک مورد جدا شد که گیاه مورد نظر در این غلظت بر آن نیز اثر داشـت. امـا بیشتر باکتریهای خانواده انتروباکتریاسیه به این گیاه مقـاوم بودند. بـه‌طـوری کـه *Terminalia catappa* بـر ۸ مـورد (۸۸/۹٪) از انـواع *klebsiella* spp. و۲ مـورد (٦٦/۷٪) از انـواع *Enterobacter* spp. بـی‌اثـر بـود. در مـورد *Escherichia coli* نیز بر نیمـی از انـواع آن اثـر نداشـت. لازم به یادآوری است که گیاه از رقت ۱۰mg/ml به پایین بر هیچ کـدام از باکتریهـا مـؤثر نبـود و MIC (Minimal Inhibitory Concentration) آن برای همه انواع حـساس ۲۰mg/ml بود (جدول ۲).

اثـر آنتـی‌بیوتیکهـای پنـی‌سـیلین، اگزاسـیلین و وانکومایـسین بـر انـواع *Staphylococcus* بررسـی شـد. تقریباً همه انواع این باکتری به پنـی‌سـیلین مقـاوم بودنـد. همچنین حدود ۵۰٪ از آنها به اگزاسـیلین مقاومـت نـشان دادند ولی وانکومایسین بـر بیـشتر انـواع آنهـا مـؤثر بـود. به‌طوری که بر ۲۳ مورد (۸۸/۵٪) انواع *Staphylococcus aureus*، ۱۰ مـورد (۹۰/۹٪) انـواع *Staphylococcus epidermidis* و یک نمونه جـدا شـده *Staphylococcus saprophyticus* اثـر داشـت (جـدول ۳). بـرای انـواع *Pseudomonas aeruginosa* از سفتازیدیم و توبرامایسین استفاده شد. این آنتی‌بیوتیکها تقریبـاً بـر همـه انـواع ایـن باکتری بی‌اثر بودند (جدول ٤). بـرای باکتریهـای خـانواده انتروباکتریاسـیه و *Acinetobacter* spp. از ایمـی‌پـنم و آمیکاسین اسـتفاده شـد. ایـن آنتـی‌بیوتیکهـا بـر ۷ نمونـه *klebsiella* spp. (۷۷/۸٪)، ۲ مـورد *Enterobacter* spp. (٦٦٪/۷) و ۲۸ نمونه *Acinetobacter* spp. (۹۳/۳٪) بی‌اثر بودند ولی بر همـه انـواع *Escherichia coli* اثـر داشـتند (جدول ۵ و شکل ۱).

در بین انواع *Staphylococcus*، ۲۰ نمونـه از آنهـا بـه اگزاسیلین مقاوم بودنـد. *Terminalia catappa* بـر بیـشتر این انواع اثر داشت. به‌طوری که بـر ۱۱ مـورد (۸٤/٦٪) از انواع *Staphylococcus aureus* مقاوم بـه اگزاسـیلین و ۵ مـورد (۸۳/۳٪) از انـواع *Staphylococcus epidermidis* مقاوم به این آنتی‌بیوتیک مؤثر بود. تنهـا مـورد جـدا شـده *Staphylococcus saprophyticus* هم به اگزاسیلین مقاوم و به *Terminalia catappa* حساس بود **(جدول ۶)**.

Archive of SID

www.SID.ir

همچنین ٤ نمونه از انواع *Staphylococcus* به وانکومایسین مقاوم بودند که گیاه مورد نظر بر بیشتر آنها مؤثر بود. به‌طوری که بر ۲ مورد (٦٦/٦٪) از انواع *Staphylococcus aureus* مقاوم به وانکومایسین اثر داشت. تنها یک مورد *Staphylococcus epidermidis* مقاوم به وانکومایسین مشاهده شد که آن هم به *Terminalia catappa* حساس بود (جدول ٦).

در مقایسه حساسیت نمونه‌ها به آنتی‌بیوتیکها و عصاره گیاهی، تفاوت اثر پنی‌سیلین با عصاره (P<0/001) و اگزاسیلین با عصاره (P<0/05) بر انواع *Staphylococcus* معنی‌دار بود، ولی تفاوت معنی‌داری در اثر وانکومایسین با عصاره (P>0/05) مشاهده نشد. در مورد انواع *Pseudomonas aeruginosa* تفاوت اثر آنتی‌بیوتیکهای سفتازیدیم و توبرامایسین با عصاره (P<0/001) معنی‌دار بود. در مورد انوع *Acinetobacter* spp. و *Escherichia coli* اختلاف معنی‌داری بین اثر آنتی‌بیوتیکهای ایمی‌پنم و آمیکاسین با عصاره (P<0/05) مشاهده شد. در حالی که تفاوت اثر این آنتی‌بیوتیکها با عصاره (P>0/05) برای انواع *Klebsiella* spp. و *Enterobacter* spp. معنی‌دار نبود.

جدول ۱- فعالیت ضد میکروبی عصاره *Terminali catappa* به روش چاهک در غلظت ٤۰mg/ml بر سوش‌های استاندارد و نمونه‌های بالینی

نوع میکروارگانیسم	قطر هاله مهار رشد[1]
Staphylococcus aureus (ATCC 25923)	۲۷
Staphylococcus epidermidis (PTCC 1114)	۲٦
Staphylococcus saprophyticus (PTCC 1440)	۲۷
Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)	۳۵
Acinetobacter baumanii (PTCC 1318)	۳۳
Escherichia coli (ATCC 25922)	۱۲
Klebsiella pneumoniae (ATCC 700603)	۸
Enterobacter aerogenes (PTCC 1221)	۷
Staphylococcus aureus	$\overline{X}^{*} = ۲۰/٦۹ \pm (۱/۵۹)^{**}$
Staphylococcus epidermidis	$\overline{X} = ۲۰/٦۳ \pm (۱/٤۳)$
Staphylococcus saprophyticus	۲۳
Pseudomonas aeruginosa	$\overline{X} = ۲٦/۹۵ \pm (۱/٦۷)$
Acinetobacter spp.	$\overline{X} = ۲٦/۷ \pm (۱/٤٤)$
Escherichia coli	$\overline{X} = ۱۱/۵ \pm (۱/۸۷)$
Klebsiella spp.	$\overline{X} = ۹/۱۱ \pm (۱/٦۱)$
Enterobacter spp.	$\overline{X} = ۷/٦٦ \pm (۰/۵۷)$

۱- قطر هاله مهار رشد بر حسب mm می‌باشد.

* میانگین قطر هاله مهار رشد

** انحراف معیار

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- باکتریهای جدا شده از زخم سوختگی ۱۰۰ بیمار، توزیع فراوانی نسبی و مطلق آنها در رابطه با اثر *Terminalia catappa* بر آنها و میانگین MIC گیاه برای انواع حساس

باکتریهای مورد مطالعه	تعداد و درصد افرادی که در زخم خود دارای میکروب مورد نظر بودند*		اثر *Terminalia catappa*[1]				میانگین MIC** گیاه برای انواع حساس برحسب mg/ml	SD (انحراف معیار)
			مقاوم[2]		حساس[2]			
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد		
Staphylococcus aureus	۲۶	۲۶	٤	۱۵/٤	۲۲	۸٤/٦	۲۰	۰
Staphylococcus epidermidis	۱۱	۱۱	۲	۱۸/۲	۹	۸۱/۸	۲۰	۰
Staphylococcus saprophyticus	۱	۱	۰	۰	۱	۱۰۰	۲۰	۰
Escherichia.coli	٦	٦	۳	۵۰	۳	۵۰	۲۰	۰
Klebsiella spp.	۹	۹	۸	۸۸/۹	۱	۱۱/۱	۲۰	۰
Enterobacter spp.	۳	۳	۲	٦٦/۷	۱	۳۳/۳	۲۰	۰
Pseudomon asaeruginosa	٤۱	٤۱	۰	۰	٤۱	۱۰۰	۲۰	۰
Acinetobacter spp.	۳۰	۳۰	۰	۰	۳۰	۱۰۰	۲۰	۰

۱- اثر گیاه با روش رقت در آگار در رقت‌های ۲۰mg/ml-۰/۰۳۹ بررسی شده است.

۲- موارد مقاوم و حساس با توجه به رشد یا عدم رشد باکتری در رقت‌های بکار رفته ثبت شده‌اند.

*: تعداد کل بیماران بیش از ۱۰۰ نفر است، زیرا بعضی از بیماران در زخم خود عفونت توأم داشته‌اند.

Minimal Inhibitory Concentration =MIC**

جدول ۳- توزیع فراوانی نسبی و مطلق انواع *Staphylococcus* مورد مطالعه در رابطه با اثر پنی‌سیلین، اگزاسیلین و وانکومایسین بر آنها

میکروارگانیسمهای مورد مطالعه	پنی‌سیلین				اگزاسیلین				وانکومایسین			
	مقاوم		حساس		مقاوم		حساس		مقاوم		حساس	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
Staphylococcus aureus	۲۵	۹٦/۲	۱	۳۸	۱۳	۵۰	۱۳	۵۰	۳	۱۱/۵	۲۳	۸۸/۵
Staphylococcus epidermidis	۱۱	۱۰۰	۰	۰	٦	٥٤/٥	۵	٤۵/۵	۱	۹/۱	۱۰	۹۰/۹
Staphylococcus saprophyticus	۱	۱۰۰	۰	۰	۱	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱۰۰

جدول ٤- توزیع فراوانی نسبی و مطلق *Pseudomonas aeruginosa* های مورد مطالعه در رابطه با اثر سفتازیدیم و توبرامایسین بر آنها

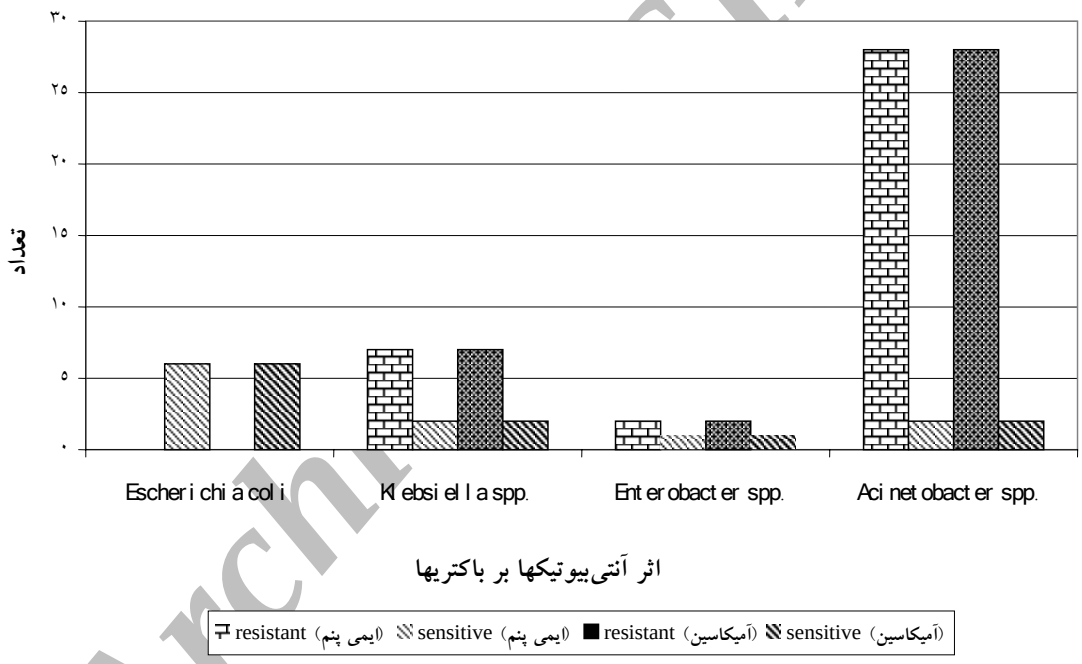
باکتری مورد مطالعه	سفتازیدیم				توبرامایسین			
	مقاوم		حساس		مقاوم		حساس	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
Pseudomonas aeruginosa	٤۱	۱۰۰	۰	۰	٤۰	۹۷/٦	۱	۲/٤

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵- توزیع فراوانی نسبی و مطلق تعدادی از باکتریهای مورد مطالعه در رابطه با اثر ایمی‌پنم و آمیکاسین بر آنها

میکروارگانیسمهای مورد مطالعه	ایمی‌پنم				آمیکاسین			
	مقاوم		حساس		مقاوم		حساس	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
Escherichia coli	۰	۰	٦	۱۰۰	۰	۰	٦	۱۰۰
Klebsiella spp.	۷	۷۷/۸	۲	۲۲/۲	۷	۷۷/۸	۲	۲۲/۲
Enterobacter spp.	۲	٦٦/۷	۱	۳۳/۳	۲	٦٦/۷	۱	۳۳/۳
Acinetobacter spp.	۲۸	۹۳/۳	۲	٦/۷	۲۸	۹۳/۳	۲	٦/۷



شکل ۱- توزیع فراوانی تعدادی از باکتریهای مورد مطالعه در رابطه با اثر ایمی‌پنم و آمیکاسین بر آنها

بحث

در این مطالعه، انواع مختلفی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی از زخم بیماران جدا شدند. در بسیاری از موارد عفونت توأم مشاهده شد. مطالعات دیگران نیز نشان می‌دهد که باکتریهای متعددی مسئول ایجاد عفونت زخم سوختگی هستند که در میان آنها باکتریهای بدست آمده در این پژوهش نیز وجود دارند. همچنین گزارش شده که درصد بروز عفونت توأم نیز بالا می‌باشد (Kamel & EL-Pirnary *et al.*, 2003؛ Davis *et al.*, 2005؛ Megaeed, 1997؛ Bowler *et al.*, 2001؛ Wonkeum *et al.*, 2001؛ Sengupta *et al.*, 2001؛ رضایی و همکاران، ۱۳۸۲).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ٦- توزیع فراوانی نسبی و مطلق انواع *Staphylococcus* مقاوم به اگزاسیلین (مقاوم به متی‌سیلین) و *Staphylococcus* های مقاوم به وانکومایسین در رابطه با اثر *Terminalia catappa* بر آنها

میکروارگانیسمهای مورد مطالعه	اثر *Terminalia catappa* بر انواع *Staphylococcus* مقاوم به اگزاسیلین				اثر *Terminalia catappa* بر انواع *Staphylococcus* مقاوم به وانکومایسین			
	مقاوم		حساس		مقاوم		حساس	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
Staphylococcus aureus	۲	۱۵/۳	۱۱	۸٤/٦	۱	۳۳/٤	۲	٦٦/٦
Staphylococcus epidermidis	۱	۱٦/۷	۵	۸۳/۳	۰	۰	۱	۱۰۰
*Staphylococcus saprophyticus**	۰	۰	۱	۱۰۰				

*، تنها نمونه *Staphylococcus saprophyticus* به وانکومایسین حساس بود.

در بین باکتریهای بدست آمده، میزان بروز *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus* و *Acinetobacter* spp. از بقیه بیشتر بود. *Pseudomonas aeruginosa* از این نظر در رتبهٔ نخست قرار داشت. این موضوع با نتایج بسیاری از تحقیقات مشابهت دارد (رضایی و همکاران، ۱۳۸۲؛ Wonkeum *et al.*, 2001؛ Kamel & EL-Megeed *et al.*, 1997). از طرفی گزارشهای مختلف بیانگر این مطلب است که میزان فراوانی انواع *Staphylococcus* و *Acinetobacter* spp. در زخم سوختگی زیاد است (Kamel & EL-Megeed, 1997؛ Wonkeum *et al.*, 2001). در بین نمونه‌های جدا شده، میزان بروز انواع باکتریهای خانواده انتروباکتریاسیه کم بود که این امر مشابه نتایج تعدادی از تحقیقات (رضایی و همکاران، ۱۳۸۲؛ Wonkeum *et al.*, 2001؛ Kamel & EL-Megeed *et al.*, 1997) می‌باشد.

در این پژوهش، اغلب آنتی‌بیوتیکهای منتخب بر باکتریها بی‌اثر بودند. انواع *Staphylococcus* همگی به پنی‌سیلین مقاومت نشان دادند. همچنین ۵۰٪ از آنها مقاوم به متی‌سیلین بودند. حتی چندین مورد مقاوم به وانکومایسین هم در بین آنها مشاهده شد. انواع *Pseudomonas aeruginosa* همگی مقاوم به آنتی‌بیوتیکهای سفتازیدیم و توبرامایسین بودند. آنتی‌بیوتیکهای ایمی‌پنم و آمیکاسین نیز بر تعداد زیادی از انواع *Acinetobacter* spp.، *Klebsiella* spp. و *Enterobacter* spp. بی‌اثر بودند و تنها انواع *Escherichia coli* به این دو دارو حساسیت نشان دادند. با توجه به این موارد، می‌توان گفت میزان مقاومت میکروبی در بین این باکتریها در حد بالایی بود که این نتایج توسط محققان دیگری نیز گرفته شده است (Pirnary *et al.*, 2003؛ Wonkeum *et al.*, 2001؛ بهار و همکاران، ۱۳۸۲)

در مطالعه حاضر که اثر عصاره متانولی میوه *Terminalia catappa* (قسمت اپی‌کارپ و مزوکارپ میوه) بر نمونه‌های جدا شده مطالعه شد، بررسی نتایج نشان داد که این گیاه بر بیشتر آنها مؤثر است. به‌طوری که همهٔ انواع *Pseudomonas aeruginosa* و *Acinetobacter* spp. به آن حساس بودند. از طرفی بیشتر

Archive of SID

www.SID.ir

انواع *Staphylococcus* به آن حساسیت نشان دادند و این موضوع در گونه‌های مختلف این باکتری یکسان بود. حتی بیشتر انواع مقاوم به متی‌سیلین و مقاوم به وانکومایسین به این گیاه حساس بودند و این نکته حائز اهمیت است. اما این گیاه بر باکتریهای خانواده انتروباکتریاسیه، اثر چندانی نداشت و تنها در مورد *Escherichia coli* بر نیمی از انواع این باکتری مؤثر بود.

در این بررسی با توجه به آزمون آماری، فعالیت ضد میکروبی عصاره گیاهی و وانکومایسین تقریباً یکسان بود و هر دو اثر خوبی بر انواع *Staphylococcus* داشتند. اما حساسیت این باکتریها به گیاه بسیار بیشتر از پنی‌سیلین واگزاسیلین بود. همچنین اثر بازدارندگی *Terminalia catappa* بر انواع *Pseudomonas aeruginosa* بسیار بیشتر از آنتی‌بیوتیکهای سفتازیدیم و توبرامایسین بود. انواع *Acinetobacter* spp. نیز حساسیت خوبی به عصاره گیاهی از خود نشان دادند، در حالی که بیشتر آنها به آنتی‌بیوتیکهای ایمی‌پنم و آمیکاسین مقاوم بودند. انواع *Klebsiella* spp. و *Enterobacter* spp.، هم به گیاه و هم به آنتی‌بیوتیکهای منتخب (ایمی‌پنم و آمیکاسین) تقریباً مقاوم بودند. تنها در مورد انواع *Escherichia coli*، حساسیت آنها به آنتی‌بیوتیکها (ایمی‌پنم و آمیکاسین) بسیار بیشتر از عصاره گیاهی بود.

در مطالعات دیگران، گزارشهایی وجود دارد مبنی بر اینکه برگ این گیاه خاصیت ضد باکتری دارد. مثلاً در تحقیقی اثر عصاره متانولی برگ *Terminalia catappa* بر چندین سوش استاندارد و بالینی امتحان شد. نتیجه نشان داد که عصاره برگ این گیاه بر انواع *Staphylococcus* (هم بالینی و هم استاندارد) مؤثر است. از طرفی این عصاره بر سوش‌های استاندارد *Pseudomonas* و *Escherichia coli* اثر نداشت (Babayi *et al.*, 2004). گزارشهای دیگری نیز وجود دارد مبنی بر اینکه عصاره‌های متیلن کلرایدی و کلروفرمی *Terminalia catappa* اثر ضد باکتریایی از خود نشان داده‌اند (Ray *et al.*, 2004).

بنابراین از آنجایی که بر طبق این تحقیق، *Terminalia catappa* بر باکتریهای شایع مولد عفونت زخم سوختگی (*Acinetobacter spp.*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus*) مؤثر است، می‌توان نتیجه گرفت که به‌طور کلی بر این عفونت مؤثر می‌باشد و باتوجه به مقاومت روزافزون باکتریهای مولد این عفونت به آنتی‌بیوتیکها که در این پژوهش و مطالعات دیگران مشاهده شده است، ضروری به نظر می‌رسد که بررسیهایی به صورت in vivo در زمینه اثرهای درمانی این گیاه انجام شود. همچنین می‌توان اثرهای آن را در عفونتهای دیگر ایجاد شده بوسیله این باکتریها امتحان کرد.

منابع مورد استفاده

- بهار، م.ع.، رضایی، ع. و رهبر، پ. ، ۱۳۸۲. مقایسه باکتریهای جدا شده از کشت زخم بیماران سوخته و بررسی حساسیتهای دارویی آنها در سالهای ۸۱-۸۰-۷۹-۷۸. ۱۶۵-۱۵۸، در: انصاری، ح.، (تدوین)، سوختگی. انتشارات عبادی‌فر، تهران، ۳۲۷ صفحه.
- رضایی، ک.، رفیعی، ع.، جوادی، ط. و طراحی، م. ج.، ۱۳۸۲. تعیین بروز عفونت در سوختگی به روش کشت بافت. ۱۸۷-۱۸۱، در: انصاری، ح.، (تدوین)، سوختگی. انتشارات عبادی‌فر، تهران، ۳۲۷ صفحه.
- زرگری، ع.، ۱۳۶۷. گیاهان دارویی. جلد دوم، مؤسسه چاپ و انتشارات دانشگاه تهران، ۹۴۲ صفحه.
- مظفریان، و.، ۱۳۸۳. درختان و درختچه‌های ایران. انتشارات فرهنگ معاصر، تهران، ۱۰۰۳ صفحه.

Archive of SID
www.SID.ir

- Adam, S., 2003. *Terminalia catappa* problems of breeding solved. Uk Discus Association (ukdiscus.Co.Uk/ *t. catappa*. Htm), Author-www.puncharddiscus.co.uk
- Babayi, H., Kolo, I., Okagun, J.I. and Ijan, u.J.J., 2004. The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic micro organisms. BIOKEMISTRI, 16(2): 106-111.
- Bowler, P.G., Duerden, B.I. and Armistrong, D.G., 2001. Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. Clinical Microbiology Reviews, 14(2): 244-269.
- Brunicardia, F.C., Andersen, D.K., Billiar, T.R., Dunn, D.L., Hunter, J.G. and Pollock, R.E., 2005. Schwartz's PRINCIPLES OF SURGERY. McGRaW-Hill Inc, New York, Chicago, 1950p.
- Cakir, B. and Yegen, B.C., 2004. Systemic Responses to burn injury. Turkey Journal medicine Science, 34: 215-226.
- Dale, K.M.R., Schnell, G. and Wong, P.J., 2004. Therapeutic Efficacy of "Nubiotics" against Burn wound Infection by Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and chemotherapy, 48(8): 2918-2923.
- Davis, K.A., Moran, C.K., McAllister, C.K. And Gray, P.G., 2005. multidrug- resistant Acinetobacter Extremity infections in soldiers. Emerging infectious diseases, Available from http://www.cdc.gov/ncidod /EID/Vol 11 no 08/05-0105htm.
- Duke, J.A., Bogenschutz-Godwin, M.J., Ducellier, J. and Duke, P-AK., 2002. Handbook of Medicinal Herbs. CRC press, Boca, Raton, London, 870p.
- Forbes, B.A., Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S., 2007. BaILEy & SCOTT's Diagnostic Microbiology. Mosby Inc, Baltimore, 1031p.
- Kamel, A.H. and EL-Megeed, E.A., 1997. The role of aztreonam in the control of gram negative burn wound infection. Annals of Burns and fire Disaster, 10(1):1-7.
- Kasper, D.L., Braunwaid, E., Fauci, A.S., Hauser, S.L., Longo, D.I. and Jameson, J.L., 2005. HARRISON'S PRINCIPLES of Internal Medicine. McGraw- Hill Inc, New York, Chicago, 2607p.
- Mahon, C.R., Lehman, D.C. and Manuselis, G., 2007. Textbook of Diagnostic microbiology. Saunders Elsevier, Missouri, 1211p.
- Miri, M.R., Hemmati, H. and Shahraki, S., 2005. Comparison of efficacy of Honey versus silver sulfadiazine and acetate mafenid in the treatment of contaminated bum wounds in piggies. Pakistan Journal medicine Science, 21(2): 168-173.
- Noumi, E. and Yomi, A., 2001. medicinal plants used for intestinal diseases in Mbalmayo Region, Central province, Cameroon. Fitotrapia, 72: 246-254.
- Pirnary, J.P., Vos, D.D., Cochez, C., Bilocq, F., Pirson, J., Struelens, M., Duinslaeger, L., Comelies, P., Zizi, M. and Vanderkelen, A., 2003. Molecular Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa colonization in Burn unit: Persistance of a Multidrug- Resistant clone and a silver sulfadiazine-Resistant clone. Journal of Clinical Microbiology, 41(3):1192-1202.
- Prajapati, N.D., Purohit, S.S., Sharma, A.K. and Kumar, T., 2003. A Handbook of Medicinal Plants. Agrobios, India, 554p.
- Ray, A.B., Sarma, B.K. and Singh, U.P., 2004. Medicinal properties of plants: Antifungal, Antimicrobial and Antiviral activities. IBDS, 536p.
- Sengupta, S., kumar, P., Ciraj, A.M. and Shivanada, P.G., 2001. Acinetobacter baumannii- An emerging nosocomial pathogen in the burns unit Manipal, India. Burns, 27:140-144.
- Unkhwan, H. and Shouguang, J., 1999. Expression of the soxR Gene of Pseudomonas aeruginosa Is Inducible during Infection of Burn wounds in mice and Is Required to cause Efficient Bacteremia. Infection and Immunity, 67(10): 5324-5331.
- Wonkeum, S., Kyu, M.L., Hee, J.K., Dong, H.S. and Dong, K.K., 2001. Microbiologic aspects of predominant bacteria from the bum patients in korea. Burns, 27:140-144.

Archive of SID

www.SID.ir

Antibacterial activity of *Terminalia catappa* L. extract against bacteria isolated from burn wounds and comparison with effects of selective antibiotics *in vitro*

M.M. Attarpour Yazdi[1*], M. Kamalinejad[2], N.S. Falvaei Koochak[3] and S. Mansouri[4]

1*- Corresponding author, Microbiology Department, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
E-mail: mmayazdi@yahoo.com, attarpouryazdi@shahed.ac.ir
2- Pharmacognosy Department, Faculty of Pharmacy, Shaheed Beheshti University, Tehran, Iran
3- Azad University, Tehran, Iran
4- Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

Received: March 2009 Revised: April 2009 Accepted: April 2009

Abstract

Burn wound is suitable site for incidence of resistant infections. Thus, the research for finding effective drugs against this problem is necessary. Medicinal herbs with antimicrobial activity have important role in traditional medicine. The purpose of this study was to determine antibacterial activity of methanolic extract of *Terminalia catappa* L. fruit against bacteria isolated from burn wound infections and to compare with effects of some selected antibiotics. First, a sample of methanolic extract of the *Terminalia catappa* fruit was prepared and then its antibacterial activity against 8 bacteria from 100 samples of burn wound infection were evaluated by well diffusion method at concentration of 40 mg/ml and then Agar Serial Dilution method in the range of 0.039-20mg/ml. Also, the MIC (Minimal Inhibitory Concentration) of extract was determined. The antibacterial activity of selective antibiotics was tested by disk diffusion method. The onava test was used to compare the results. The results from the antibacterial tests demonstrated that the *Terminalia catappa* methanolic extract had been effected against all of *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter spp.* and more than 80% of *Staphylococcus aureus/epidermidis/saprophyticus*, and against 50% of *Escherichia coli*. The MIC of the extract against all the sensitive cases was 20 mg/ml. The bacteria were often resistant to selective drugs .There was significant difference between the effects of plant and antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* (P<0/001), *Acinetobacter spp*. (P<0/05) and *Staphylococcus* cases (P<0/05). This study demonstrated that methanolic extract of *Terminalia catappa* have excellent antibacterial activity against most of bacteria isolated from burn wound infections and its effect is better than selective antibiotics. However, we need more *in vitro* and *in vivo* investigation.

Key words: *Terminalia catappa* L., Burn wound infection, Methanolic extract, Antibacterial.

Archive of SID

www.SID.ir