



اثر ضد باکتریایی آلپسین، نانوذرات نقره و ترکیب آن‌ها علیه عفونت پوستی سودوموناس آئروژینوزا در مدل حیوانی

فاطمه میرزایی^۱، مجتبی صلوتی^{۲*}، رضا شاپوری^۲، حامد علیزاده^۳

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، گروه میکروبیولوژی، زنجان، ایران.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، مرکز تحقیقات بیولوژی، زنجان، ایران.

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، زنجان، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۲/۱۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۹/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: به دلیل مقاومت باکتری‌ها، آنتی بیوتیک‌های معمول ممکن است در برابر عوامل بیماری‌زای چند مقاومتی بی‌فایده باشند. استفاده از فناوری نانو و ترکیبات موثر گیاهان، می‌تواند راهکار مناسبی برای حل این مشکل باشند. هدف از تحقیق حاضر بررسی خاصیت ضد میکروبی آلپسین، نانوذرات نقره و ترکیب آن‌ها علیه عفونت پوستی ناشی از سودوموناس آئروژینوزا در مدل حیوانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، حداقل غلظت ممانعت از رشد MIC و حداقل غلظت کشنده باکتری MBC برای آلپسین، نانو ذرات نقره و ترکیب آن‌ها با روش ماکرودیولوشن تعیین شد. در ناحیه کتف ۱۲ سر موش سوری، عفونت پوستی با باکتری سودوموناس آئروژینوزا ایجاد شد و اثر آلپسین، نانوذرات نقره و اثر ترکیب آن‌ها به صورت پماد بر روی عفونت ایجاد شده بررسی گردید.

نتایج: MIC و آلپسین بر روی سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۲/۳۸ و ۴/۷۷ میلی گرم بر میلی لیتر و MIC و MBC نانو ذرات نقره به ترتیب ۳/۱۲ و ۶/۲۵ ppm بودند. MIC و ترکیب آلپسین و نانوذرات نقره بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۰/۵۹ میلی گرم بر میلی لیتر و ۱/۵ ppm، ۱/۱۹ میلی گرم بر میلی لیتر و ۳/۱۲ ppm بودند. مطالعه مدل حیوانی اثر ضد میکروبی آلپسین، نانوذرات نقره و اثر هم افزایی ترکیب آلپسین و نانوذرات نقره را بر علیه عفونت پوستی ناشی از سودوموناس آئروژینوزا تایید کرد.

نتیجه‌گیری: ترکیب آلپسین و نانوذرات نقره دارای اثر هم افزایی علیه عفونت پوستی ناشی از باکتری سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد.

کلمات کلیدی: عفونت پوستی، سودوموناس آئروژینوزا، آلپسین، نانوذرات نقره، اثر هم افزایی

مقدمه

جراحی و سوختگی می‌گردد که در این بخش‌ها به عنوان اولین عامل عفونت‌های پوستی و سپتی سمی معرفی شده است. عفونت‌های جراحی و سوختگی با این باکتری ممکن است سپتی سمی، پنومونی، مننژیت و بیماری‌های کشنده‌ی دیگر را به دنبال داشته باشد (۱). عفونت‌های مهم بالینی سودوموناس آئروژینوزا اغلب در برابر رژیم تک دارویی مقاوم می‌باشند و بیشتر از یک نوع پنی سیلین مانند تیکارسیلین یا مزلو سیلین همراه با یک آمینو گلیکوزید مانند جنتا مایسین و یا آمیکاسین علیه این باکتری

باکتری سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی است که به عنوان یکی از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی، به خصوص در زخم‌های تمیز بیماران عمل شده، می‌باشد (۱). این باکتری، روی پوست مرطوب و در روده‌ی افراد سالم نیز وجود دارد و در بیمارستان‌ها از بطری‌های حاوی مواد آنتی سبتیک نیز جدا می‌شود. این باکتری منجر به پیدایش همه گیری‌های کوچک در شیرخوارگاه‌ها و بخش‌های مراقبت ویژه، به خصوص بخش‌های

* نویسنده مسئول: مجتبی صلوتی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، مرکز تحقیقات بیولوژی، زنجان، ایران. تلفن: ۰۲۴۱۴۲۲۴۰۲۴
Email: saloutim@yahoo.com

ذرات نقره و بتالاکتام بر روی باکتری/شریشیالکی در سال ۲۰۰۵ توسط پینگ و همکاران بررسی شد، وقتی آموکسی سیلین و نانو ذرات نقره با هم ترکیب می‌شوند اثر ضد باکتریایی قویتری بر روی سلول‌های /شریشیالکی نسبت به زمانی که به طور جداگانه استفاده می‌شوند، دارند (۱۰). با توجه به مطالعات انجام شده، هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر ضد میکروبی آلپسین، نانوذرات نقره و ترکیب آن‌ها علیه عفونت پوستی ناشی از سودوموناس آئروژینوزا در مدل حیوانی است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC:27853 از بانک میکروبی انیستیتو پاستور ایران تهیه گردید. تعداد ۱۲ سر موش سوری ماده ۸-۶ هفته‌ای از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سوسپانسیون نانوذرات نقره با غلظت ۴۰۰۰ ppm با نام تجاری NANOCOLLOID از کمپانی NANOCID تهیه گردید. برای به دست آوردن آلپسین از سیر، عصاره کلروفرمی آن تهیه گردید. پس از تقطیر کلروفرم، عصاره روغنی غلیظ به رنگ زرد تا سبز تیره با بوی تند سیر به دست آمد. سپس این عصاره در شیشه درب‌دار و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد برای مصارف بعدی نگهداری شد (۱۱). به منظور تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد (Minimum Inhibitory Concentration- MIC) و حداقل غلظت کشنده باکتری (Minimum Bactericidal Concentration-MBC) آلپسین، نانو ذرات نقره و ترکیب آن‌ها از روش برات ماکرودیلوشن (Broth Macrodilution Method) استفاده شد. از کلونی‌های حاصل از کشت‌های استوک از محیط کشت مغذی بروسلا برات بر روی محیط مولر هینتون آگار (۲۴ تا ۴۸ ساعت پس از کشت و در فاز لگاریتمی رشد باکتری‌ها)، در سرم فیزیولوژی سوسپانسیونی برابر ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد. کدورت باکتریایی ۰/۵ مک‌فارلند به نسبت ۱:۳۰۰ رقیق شد تا تعداد باکتری‌ها 5×10^5 CFU/ml شود. برای تعیین MIC و MBC، آلپسین با غلظت‌های ۱/۵۲/۸، ۷۶/۴، ۳۸/۲، ۱۹/۱، ۹/۵۵، ۴/۷۷، ۲/۳۸، ۱/۱۹، ۰/۵۹، ۰/۲۹ میلی گرم بر میلی لیتر و نانوذرات نقره با غلظت‌های ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲، ۳/۱، ۱/۵، ۰/۷۸ ppm و ترکیب آلپسین و نانوذرات نقره با غلظت‌های ذکر شده در محیط کشت مولر هینتون

استفاده می‌شود (۲). اخیراً با توجه به اثرات جانبی آنتی بیوتیک های مصرفی و به دلیل مقاومتی که سودوموناس آئروژینوزا در برابر آن‌ها کسب نموده است، ابداع روش‌های نوین و قطعی در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری ضروری به نظر می‌رسد (۳).

امروزه از نانوذرات نقره به طور وسیعی در پزشکی جهت مقابله با میکروب‌ها استفاده می‌شود (۴). نانوذرات نقره، خاصیت ضد میکروبی قوی علی‌ه طیف وسیعی از باکتری‌ها از جمله سودوموناس آئروژینوزا از خود نشان می‌دهند. با این که مکانیسم اثر نانوذرات نقره بر روی میکروب‌ها کاملاً مشخص نشده است ولی احتمالاً یون‌های نقره باعث ایجاد آسیب‌هایی در غشای سلولی باکتری‌ها می‌شوند (۵). ترکیبات ضد میکروبی گیاهی نیز یکی از منابع با ارزش در پزشکی به شمار می‌آیند؛ لذا با توجه به گسترش بیماری‌های عفونی، شناسایی تعداد بیشتری از گیاهان دارویی و جداسازی و خالص سازی ترکیبات موثر آن‌ها در درمان بیماری‌ها موثر خواهد بود (۶). سیر با نام علمی *Allium sativum* متعلق به خانواده Liliaceae، هزاران سال است که مصارف دارویی دارد. یکی از فعال‌ترین ترکیبات بیولوژیکی سیر آلپسین می‌باشد. آلپسین یک ترکیب گوگردی است که برای اولین بار در سال ۱۹۴۰ از سیر جدا شده است و تاکنون اثرات ضد میکروبی این ماده در برابر بسیاری از ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها نشان داده شده است (۷). میان‌کنش ترکیبات گوگردی مانند آلپسین با گروه‌های سولفور آنزیم‌های میکروارگانیسم‌ها باعث مهار رشد باکتری می‌شود (۸). مطالعات نشان می‌دهد آلپسین به تنهایی خاصیت ضد میکروبی ضعیفی دارد ولی وقتی با عامل ضد میکروبی دیگر ترکیب شود، اثر خوبی از خود نشان می‌دهد. در سال ۲۰۰۷ یان و همکاران اثر ضد میکروبی ترکیب آلپسین و بتالاکتام‌ها را بر روی گونه‌های *استافیلوکوکوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* بررسی کردند و وجود اثر هم افزایی بین آلپسین و بتالاکتام‌ها بر روی این باکتری‌ها را به اثبات رساندند (۸). چانگ و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثر هم افزایی روغن سیر و الکل آللیل به دست آمده از آلتین سیر را بر روی مخمر بررسی کردند و نتیجه گرفتند که هر دو به تنهایی خاصیت ضد میکروبی یکسانی دارند ولی وقتی با هم ترکیب می‌شوند اثر ضد میکروبی قابل توجهی از خود نشان می‌دهند (۹). اثر هم افزایی خاصیت ضد میکروبی نانو



(۱۴). دو روز پس از عفونی شدن موش‌ها درمان شروع شد. برای ایجاد پماد درمانی، از اوسرین به عنوان پماد پایه استفاده شد. به این صورت که برای درمان موش‌های گروه درمان با نانوذرات نقره یک گرم پماد اوسرین با ۲۰۰ میکرو لیتر نانوذرات نقره (با غلظت ۴۰۰۰ ppm) ترکیب شد. برای گروه درمان با آلایسین، یک گرم پماد اوسرین با ۲۰۰ میکرو لیتر آلایسین (با غلظت ۱۵۲۸ میلی-گرم بر میلی‌لیتر) ترکیب شد و هم چنین برای گروه هم افزایی مقدار یک گرم پماد اوسرین با ۲۰۰ میکرو لیتر نانوذرات نقره و ۲۰۰ میکرو لیتر آلایسین ترکیب شد و برای گروه کنترل تنها از اوسرین استفاده شد. به مدت دو روز درمان انجام گرفت. هم چنین برای تسکین سوزش ناشی از سیر از داروی بی حس کننده لیدوکائین استفاده گردید (۱۶). ۲ روز پس از تیمار موش‌ها با پمادهای مورد نظر (چهارمین روز بعد از عفونی کردن زخم)، برای بررسی وضعیت بهبود عفونت، از محل زخم به وسیله سوآپ استریل نمونه‌گیری شد بدین ترتیب که ابتدا سوآپ استریل با نرمال سالین استریل به طور کامل مرطوب شد و به آرامی به محل زخم عفونی شده کشیده شد و سپس با کمک قیچی استریل شده در فور، پنبه انتهای سوآپ برش داده شده و به ۲ میلی لیتر محیط کشت مولر هینتون براث موجود در لوله آزمایش که قبلاً آماده شده بود منتقل شد. برای هر موش به طور جداگانه این کار انجام گرفت. سپس دهانه لوله‌ها با پنبه و فویل بسته شد و تا ۲۴ ساعت به باکتری‌ها اجازه رشد در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد داده شد (۱۷). بعد از ۲۴ ساعت، از لوله‌های نمونه‌گیری به منظور قابل شمارش کردن باکتری‌ها، رقت تهیه گردید. بدین ترتیب که برای هر موش، ۶ رقت در نظر گرفته شد. در نتیجه برای هر موش، ۶ لوله آزمایش، هر لوله محتوی ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل آماده شد. لوله آزمایش محتوی سوآپ را از انکوباتور خارج کرده به خوبی شیک داده و به کمک سمپلر مقدار ۱ میلی لیتر از محیط را برداشته و به ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی اضافه گردید. با استفاده از شیکر، لوله محلول بهم زده شد و از رقت حاصل نیز ۱ میلی لیتر برداشته و به ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی دوم اضافه گردید و با استفاده از شیکر، لوله محلول بهم زده شد. مجدداً این پروتکل تکرار گردید. در نهایت جمعاً ۶ رقت مختلف ۰/۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۰۰۱ تهیه شد. سپس از ۳ رقت آخر در پلیت مولر هینتون آگار کشت داده شد (۱۳، ۱۸،

براث تهیه گردید. باکتری مذکور با غلظت 5×10^5 CFU/ml در محیط دارای غلظت‌های مختلف آلایسین، نانوذرات نقره و ترکیب آلایسین و نانوذرات نقره اضافه شد. در هر سری آزمایش یک لوله فاقد ترکیب ضد میکروبی مورد نظر به عنوان لوله کنترل در نظر گرفته شد. تمامی لوله‌ها با پنبه استریل مسدود شدند. لوله‌های آماده شده به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. تعیین MIC بدین صورت بود که ابتدا لوله‌ها بر روی شیکر کاملاً مخلوط شدند و پس از آن از مایع داخل هر یک از لوله‌ها ۱۰۰ میکرولیتر با استفاده از سمپلر برداشته و بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل گردید و با استفاده از آنس استریل بر روی محیط کشت پخش گردید. پلیت‌های تهیه شده به مدت ۲۴ ساعت در همان شرایط انکوبه شدند. اولین لوله از غلظت‌های پایین ترکیب ضد میکروبی مورد آزمایش که فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری بود به عنوان غلظت MIC و اولین لوله از غلظت‌های ماده مورد آزمایش که در آن‌ها ۹۹/۹ درصد از مقدار اولیه باکتری‌های اضافه شده از بین رفته بودند و در ساب کالچر فقط ۰/۱ درصد از باکتری‌ها رشد کرده بودند به عنوان غلظت MBC تعیین گردید. تمام مراحل فوق با ۳ بار تکرار انجام گردید (۱۲، ۱۳). به منظور بررسی اثر درمانی آلایسین، نانوذرات نقره و ترکیب آن‌ها بر روی عفونت پوستی ناشی از سودوموناس آئروژینوز/ در مدل حیوانی، ۱۲ سر موش سوری ماده ۸-۶ هفته‌ای به ۴ گروه ۳ تایی تقسیم شدند. گروه اول تیمار با پماد نانوذرات نقره، گروه دوم تیمار با پماد آلایسین، گروه سوم تیمار با پماد ترکیب نانوذرات نقره و آلایسین و گروه چهارم به عنوان گروه کنترل، بودند. در ابتدا جهت انجام بیهوشی، مخلوط دو داروی کتامین (۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن) و زایلازین (۵ میلی گرم به ازای هر گرم وزن) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. بعد از بیهوشی ناحیه پشت گردن هر موش به وسیله پنبه الکلی به طور کامل استریل شد و با تیغ استریل، موهای این ناحیه به صورت دایره‌ای به قطر ۱ سانتیمتر تراشیده شد. سپس برای ایجاد زخم در این ناحیه شیاری به طول ۱ سانتی‌متر ایجاد شد و مقدار نیم مک‌فارلند باکتری ($10^4 \times 1/5$) به محل زخم وارد شد. برای جلوگیری از لیسیدن محل زخم موش‌ها توسط موش‌های دیگر، هر موش به قفس جداگانه‌ای منتقل گردید و ۲ روز فرصت داده شد تا محل زخم به طور کامل عفونی شود (۱۵)،

دارای اثر هم افزایی بر روی باکتری مذکور می‌باشند. در مدل حیوانی، باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا در روز سوم بعد از درمان شمارش شدند و میانگین آن‌ها بر حسب CFU/ml شمارش شد که در جدول ۱ آورده شده است. همان طور که در جدول ۱ دیده می‌شود تعداد باکتری‌های گروه کنترل اختلاف معنی داری با همه گروه‌ها دارد. از طرفی با مقایسه تعداد باکتری‌های شمارش شده در گروه‌های تیمار شده با پماد آلپسین و نانوذرات نقره با گروه تیمار شده با پماد ترکیبی آن‌ها می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب آلپسین و نانوذرات نقره دارای خاصیت ضد میکروبی علیه عفونت پوستی ناشی از سودوموناس آئروژینوزا به صورت هم افزایی می‌باشد.

بحث و نتیجه گیری

افزایش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا مشکلات زیادی را برای بیماران ایجاد نموده است که سبب مشکلات زیادی در درمان و نیز افزایش ابتلا و مرگ و میر می‌شود. مقاومت خاص این باکتری به آنتی بیوتیک‌های مختلف اهمیت آن را در عفونت‌های بیمارستانی دو چندان کرده است (۱۹). بیشتر عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا به صورت عفونت‌های پوستی ظاهر می‌شوند. توانایی سودوموناس برای به دست آوردن سریع مقاومت آنتی بیوتیکی ثابت شده است و بحث‌های زیادی در مورد داروهای ضد سودوموناس مطرح است و مزایای استفاده از درمان ترکیبی ضد میکروبی در مقابل درمان

(۱۹). ۰/۲ میلی لیتر از هر رقت توسط سمپلر برداشته شد و در پلیت استریل حاوی مولر هینتون آگار ریخته شد و به کمک آنس استریل به طور یکنواخت کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید (۱۸). سپس شمارش کلنی‌ها انجام پذیرفت و نتایج به صورت CFU/ml گزارش گردید. نویسندگان مقاله در تمام مراحل آزمایش ملزم به رعایت حقوق حیوانات آزمایشگاهی بر اساس پروتکل‌های اخلاق پژوهشی بوده‌اند.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از این مطالعه با نرم افزار آماری SPSS 18 و آزمون آماری One Way ANOVA مورد تحلیل قرار گرفت. در این آزمون $P\text{-value} < 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

میزان MIC و MBC آلپسین بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۲/۳۸ و ۴/۷۷ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد. میزان MIC و MBC نانوذرات نقره برای باکتری مذکور به ترتیب ۳/۱۲ ppm و ۶/۲۵ ppm گزارش شد. MIC و MBC ترکیب آلپسین و نانوذرات نقره بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۰/۵۹ mg/ml و ۱/۵ ppm و ۱/۱۹ mg/ml و ۳/۱۲ ppm بودند. تحلیل آماری مشخص نمود که آلپسین و نانوذرات نقره دارای اثر ضد میکروبی بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا می‌باشند. همچنین ترکیب آلپسین و نانوذرات نقره

جدول ۱: میانگین باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا شمارش شده بعد از روز دوم درمان

گروه	پمادهای مورد استفاده	میانگین تعداد باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا شمارش شده دو روز بعد از تیمار با پمادها بر حسب CFU/ml
۱	کنترل	281×10^7
۲	نانوذرات نقره	96×10^5
۳	آلپسین	35×10^6
۴	ترکیب نانوذرات نقره و آلپسین	صفر



باکتری‌های شمارش شده در جدول ۱ نشان می‌دهد که ترکیب آلیسین و نانوذرات نقره در مدل حیوانی نیز اثر هم افزایی علیه عفونت پوستی ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* دارد. آنالیز آماری نتایج به دست آمده از میانگین تعداد باکتری‌های شمارش شده در دو روز بعد از مصرف پماد، نشان داد که اختلاف معنی داری بین گروه کنترل و بقیه گروه‌ها وجود دارد. در مجموع نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ترکیب نانوذرات نقره و آلیسین سیر، می‌تواند باعث از بین رفتن عفونت پوستی ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* شود و می‌توان امیدوار بود که در آینده بتوان با انجام آزمایش‌های تکمیلی در بالین از آن در درمان عفونت‌های پوستی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از کارکنان مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان کمال تشکر و قدردانی را به عمل می‌آورند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده اند.

تک دارویی در حال بررسی می‌باشد (۲۰). امروزه به علت آثار شناخته شده جانبی و ناخواسته بسیاری از داروهای مصنوعی، استفاده از مواد گیاهی و طبیعی در درمان عفونت‌ها مورد توجه قرار دارد. بیش از ۸۰ درصد مردم دنیا برای درمان بیماری‌های پوستی به پزشکی سنتی رجوع می‌کنند که از آن میان یک سوم همه داروهای پزشکی سنتی مربوط به بیماری‌های پوستی است (۲۱). قبلاً اثر ضد میکروبی آلیسین سیر و نانوذرات نقره بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط برون تنی بررسی شده است (۲۲). ولی تاکنون هیچ مطالعه‌ای بر روی اثر ضد میکروبی آلیسین، نانوذرات نقره و ترکیب آن‌ها به صورت پماد موضعی بر علیه عفونت پوستی ناشی از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* انجام نشده است. نتایج ماکرودیلوشن در مطالعه حاضر نشان داد که ترکیب آلیسین و نانوذرات نقره در رقت‌های کمتر نسبت به هر کدام از این عوامل به تنهایی دارای خاصیت ضد میکروبی بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد. نتایج مدل حیوانی نیز نشان داد که آلیسین و نانوذرات نقره به صورت پماد موضعی در بهبود زخم عفونی شده توسط *سودوموناس آئروژینوزا* بسیار موثر بوده و دارای اثر ضد میکروبی می‌باشند. همچنین مقایسه میانگین تعداد

References

1. Japani A, Farshad S, Alborzi A. Pseudomonas aeruginosa: Burn Infection, Treatment and Antibacterial Resistance. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2009; 11(3): 244-253.
2. Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. Journal of the Royal Society of Medicine. 2002; 95(41): 22-26.
3. Hancock REW, Speert DP. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and impact on treatment. Drug Resistance Updates. 2000; 3(4): 247-255.
4. Marambio JC, Hoek EMV. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. Journal of Nanoparticle Research. 2010; 12(5):1531-51.
5. Safavi K, Esfahanizadeh M, Mortazaeinezhad F, Dastjerd H. The Study of Nano Silver (NS) Antimicrobial Activity and Evaluation of Using NS in Tissue Culture Media. International Conference on Life Science and Technology. 2011; 1(3): 159-161.
6. Kokoska L, Polesny Z, Rada V, Nepovim A, Vanek T. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology. 2002; 82(1):51-53.
7. Kathi J, Kemper MD, MPH. Garlic (Allium sativum). The Longwood Herbal Task Force. 2000; (4):1-49.
8. Cai Y, Wang R, Pei F, Liang B.B. Antibacterial Activity of Allicin Alone and in Combination with β -Lactams against Staphylococcus spp. and Pseudomonas aeruginosa. Japan Antibiotics Research Association. 2007; 60(5): 335-338.



9. Chung I, Kwon S.H, Shim S.T, Kyung K.H. Synergistic Antiyeast Activity of Garlic Oil and Allyl Alcohol Derived from Alliin in Garlic. *Journal of Food Science*. 2007; 72(9): 437-440.
10. Ping Li, Juan Li, Changzhu Wu, Qingsheng Wu, Jian Li. Synergistic antibacterial effects of β -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005; 16(4): 1912-1917.
11. Kora AJ, Arunachalam J. Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanism of action. *World journal of microbiology & biotechnology*. 2011; 27(5):1209-16.
12. Mohsen Nezhad F. Antibacterial Activity of Eukalyptus Extracts on Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus*. *Research Journal of biological Sciences*. 2009; 4(8): 905-908.
13. Dai T, Tegos GP, Zhiyentayev T, Mylonakis E, Hamblin MR. Photodynamic Therapy for Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Infection in a Mouse Skin Abrasion Model. *NIH-PA Author Manuscript*. 2010; 42(1): 1-14.
14. Madigan M.T, Martinko J.M, Parker J. Brock Biology of Microorganisms. 10th ed. New Jersey: Prentice Hall Int. Ltd; 1997. p. 82-87.
15. Festing FW. International index of laboratory animals. 4th ed, London. Medical research council laboratory animals center, 1980.p.10-135.
16. Naeini A, Khosravi A, Tadjbakhsh H, Ghazanfari T, Yaraee R, Shokri H. Evaluation of the immunostimulatory activity of *Ziziphora tenuior* extracts. *Comparative Clinical Pathology*. 2010; 19(5):459-63.
17. Ansari MA, Khan HM, Khan AA, Malik A, Sultan A, Shahid M, et al. Evaluation of antibacterial activity of silver nanoparticles against MSSA and MRSA on isolates from skin infections. *Biology and Medicine*. 2011; 3(2): 141-146.
18. Ghasemi Pirbalouti A, Yousefi M, Nazari H, Karimi I, Koohpayeh A. Evaluation of burn healing properties of *arnebja euchroma* and *malva sylvestris*. *J Biol*. 2009; 5(3): 62-66.
19. Kianpour F, Havaei SA, Hosseini MM. Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from coetaneous infections and determination of drug resistance pattern in patients of Alzahra hospital in Esfahan. *Journal of Isfahan Medical School*. 2010; 28(110), 503-509.
20. WU DC, Chan WW, Metelitsa AL, Fiorillo L, Lin AN. *Pseudomonas* skin infection: clinical features. *Epidemiology and management American journal of clinical dermatology*. 2011; 12(3): 157-69.
21. Lkhagvajav N, Yasa I, Celik E, Koizhaiganova M, Sari O. Antimicrobial Activity of colloidal Silver Nanoparticles Prepared by Sol-Gel Method. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 2011; 6(1): 149 – 154.
22. Durairaj S, Srinivasan S, Lakshmanaperumalsamy P. In vitro Antibacterial Activity and Stability of Garlic Extract at Different pH and Temperature. *Electronic Journal of Biology*. 2009; 5(1): 5-10.



Original Article

Antibacterial Effect of Allicin, Silver Nano Particles, and Their Combination against Skin Infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in Animal Model

Mirzaei F¹, Salouti M^{2*}, Shapouri R², Alizadeh H³

1- Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

2- Biology Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

3- Young Researchers and Elite Club, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

Received: 16 Dec 2013

Accepted: 05 May 2014

Abstract

Background & Objective: Common antibiotics may be useless against multiple pathogens because of the multidrug resistance. Therefore, new ways of nanotechnology and effective herbal combination can be the solution for this problem. The objective of this study is to investigate the antimicrobial effect of Allicin, silver nano particles and their combination against skin infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in animal model.

Materials & Methods: In this experimental study, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of Allicin, silver nano particles, and their combination were determined by macro dilution susceptibility test. Skin infection was produced in the shoulder region of 12 mice using *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of ointment of Allicin, silver nano particles, and their combination were evaluated.

Results: The results showed that MIC and MBC of Allicin for *pseudomonas aeruginosa* were 2.38 and 4.77 mg/ml, respectively. MIC and MBC of silver nano particle for *Pseudomonas aeruginosa* were 3.12 and 6.25 ppm, respectively. MIC and MBC of combination of Allicin and silver nano particles on *Pseudomonas aeruginosa* were 0.59 mg/ml and 1.5 ppm, 1.19 mg/ml and 3.12 ppm, respectively. Anti-microbial effect of Allicin, silver nano particles and the synergistic activity of their combination against skin infections due to *Pseudomonas aeruginosa* was observed in animal model.

Conclusion: The results showed that Allicin in combination with silver nano particles have synergistic effect against skin infection due to *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: Skin Infection, *Pseudomonas aeruginosa*, Allicin, silver Nanoparticles, Synergistic Effect

* **Corresponding author: Mojtaba Salouti**, Biology Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
E-mail: saloutim@yahoo.com
Tel: +98 241 4224024