

## بررسی اثرات هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک فسفومایسین و اسانس گیاه *Citrus aurantifolia* بر روی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس ارئوس

بفرین زاهدی<sup>۱</sup>، جاوید اقبال<sup>۲</sup>، مینو زردشتی<sup>۳</sup>، نیما حسینی جزنی<sup>۴</sup>\*

تاریخ دریافت 1393/12/25 تاریخ پذیرش 1394/02/25

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** استافیلوکوکوس اورئوس کوکسی گرم مثبت و عامل ایجاد طیف وسیعی از عفونت‌ها است. مقاومت به متی‌سیلین در این باکتری معمولاً با مقاومت به شمار متعددی از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها همراه است و شیوع بالای این ایزوله‌ها می‌تواند شکست‌های درمانی را موجب گردد. فسفومایسین از جمله آنتی‌بیوتیک‌های مهارکننده بیوسنتز پپتیدوگلیکان است که در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های متعدد کاربرد دارد. اثرات ضد میکروبی اسانس *Citrus aurantifolia* بر روی استافیلوکوکوس‌های مقاوم به متی‌سیلین قبلاً نشان داده شده است. در این مطالعه برای اولین بار اثرات کاربرد توأم غلظت‌های تحت‌کشنده فسفومایسین و اسانس *Citrus aurantifolia* در تشدید اثرات ضد میکروبی یکدیگر در شرایط برون تنی بر روی ایزوله‌های بالینی مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس ارئوس مورد بررسی قرار گرفته است.

**روش کار:** ۲۳ ایزوله بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین با روش‌های استاندارد از نمونه‌های بالینی جمع‌آوری و شناسایی شدند. مقادیر حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشنده فسفومایسین با رقت‌های متوالی از آنتی‌بیوتیک در محیط کشت مایع در دامنه غلظت حداقل ۰/۲۵ - ۱۲۸ میلی‌گرم در لیتر و مقادیر حداقل غلظت کشنده اسانس *Citrus aurantifolia* در دامنه غلظت ۰/۱۰ - ۰/۷۸٪ حجمی از اسانس تعیین شد. به‌منظور بررسی اثرات سینرژیستیک غلظت‌های مختلفی از اسانس به محیط کشت مایع با روش رقیق‌سازی متوالی اضافه شد. سپس بالاترین غلظتی از فسفومایسین که از حداقل غلظت کشنده فسفومایسین برای هر ایزوله کمتر بود، به کلیه لوله‌ها اضافه شد و باکتری مورد آزمایش تلقیح شد. پس از طی زمان کافی حداقل غلظت کشنده آنتی‌بیوتیک در حضور اسانس با روش ذکرشده تعیین شد.

**یافته‌ها:** از ۲۳ ایزوله مقاوم به اگراسیلین ۱۳ درصد نسبت به تمامی غلظت‌های مورد مطالعه از فسفومایسین حساس و ۸/۷ درصد مقاوم بودند. میانگین حداقل غلظت بازدارنده در مورد سایر ایزوله‌های استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی‌سیلین با محاسبه میانگین  $SD \pm Min$  برابر با  $52/9 \pm 56$  میکروگرم در میلی‌لیتر و میانگین حداقل غلظت کشنده  $76/11 \pm 42/15$  تعیین شد. میانگین حداقل غلظت کشنده اسانس در مورد کلیه ایزوله‌ها برابر با  $3 \pm 4$ ٪ تعیین شد. در ۷۷ درصد ایزوله‌های تحت بررسی حالت سینرژیسم مشاهده شد و در ۲۳ درصد ایزوله‌ها تأثیر سینرژیستیک اسانس و دارو به اثبات نرسید.

**بحث و نتیجه‌گیری:** با توجه به مقاومت بالای ایزوله‌های تحت بررسی در مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعات مشابه، لزوم بررسی دقیق حساسیت آنتی‌بیوتیکی، برای ارائه الگوی درمانی مناسب ضروری به نظر می‌رسد و نشان می‌دهد که فسفومایسین باید با احتیاط مورد استفاده قرار گیرد. همچنین با توجه به اثرات سینرژیستیک اسانس و فسفومایسین کاربرد همزمان این دو ترکیب به‌عنوان مواد ضد میکروبی پس از انجام مطالعات تکمیلی پیشنهاد می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** استافیلوکوکوس اورئوس، فسفومایسین، حداقل غلظت مهارکننده رشد، حداقل غلظت کشنده، اسانس *Citrus aurantifolia*

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و ششم، شماره چهارم، ص 327-333، تیر 1394

آدرس مکاتبه: بخش باکتری‌شناسی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، جاده نالو، ارومیه، تلفن: ۰۹۱۴۳۴۶۴۲۲۴

Email: n\_jazani@yahoo.com

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، گروه زیست‌شناسی واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

<sup>۲</sup> استادیار گروه پیراپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

<sup>۳</sup> کارشناس آزمایشگاه میکروب‌شناسی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

<sup>۴</sup> استاد میکروب‌شناسی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

**مقدمه**

جنس استافیلوکوکوس شامل کوکسی‌های گرم مثبت است که به شکل خوشه‌انگوری آرایش می‌یابند. گونه‌های استافیلوکوکوس بر روی پوست و غشای مخاطی انسان و محیط پیرامون یافت می‌شوند. از میان گونه‌های متعدد این جنس گونه‌های ارئوس، اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس از نظر بالینی اهمیت بیشتری دارند. استافیلوکوکوس ارئوس بیماری‌زاترین گونه است و حدود ۵۰-۲۰ درصد افراد ناقل این باکتری در بینی خود هستند (۱). استافیلوکوکوس ارئوس به علت دارا بودن فاکتورهای متعدد بیماری‌زایی، توانایی بیماری‌زایی بالایی داشته و طیف وسیعی از بیماری‌ها را به شکل عفونت و مسمومیت غذایی، باکتری، اندوکاردیت، مننژیت، استومولیت حاد و آبسه‌های منتشر در تمام اعضا را ایجاد می‌کند. همچنین استافیلوکوکوس ارئوس رایج‌ترین عامل ایجاد عفونت در زخم‌های پوستی و سوختگی است. این باکتری توانایی منحصربه‌فردی در مقاوم شدن به انواع مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها را دارا است. ایزوله‌های برخوردار از مقاومت دارویی چندگانه اغلب به انواع بیمارستانی تعلق داشته، می‌توانند منشأ عفونت‌های موردی یا اپیدمی‌های بیمارستانی شوند. مقاومت به متی‌سیلین در سوبه‌های بالینی استافیلوکوکوس یک شاخص مهم است، زیرا با مقاومت به تعدادی از دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها مرتبط است. استافیلوکوکوس‌های مقاوم به متی‌سیلین از عوامل مهم ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند. شیوع بالای استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی‌سیلین می‌تواند استفاده از تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها را برای درمان عفونت‌های استافیلوکوکی غیرممکن کرده و یا باعث شکست درمان شود (۲۰۱). با توجه به مقاومت بالای استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی‌سیلین به انواع متفاوتی از آنتی‌بیوتیک‌ها، لزوم طراحی و معرفی ترکیبات ضد میکروبی جدید برای کنترل عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها احساس می‌شود.

فسفومایسین از جمله آنتی‌بیوتیک‌های مهارکننده پپتیدوگلیکان است. این آنتی‌بیوتیک یک آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف است که آنزیم UDP-N-Acetyl glucosamine 3 enolpyruvyl transferase (MurA) را مهار می‌کند. آنزیم (MurA) در واقع باعث اتصال فسفوانول پیرووات (PEP) به گروه ۳-هیدروکسیل از UDP-N-Acetyl glucosamine می‌شود و ساختار استیل‌مورامیک اسید می‌شود. کارایی فسفومایسین در کنترل عفونت ناشی از استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی‌سیلین نشان داده شده است و نیز ثابت شده است که کاربرد فسفومایسین در رژیم‌های درمانی ترکیبی در عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی‌سیلین کارایی آنتی‌بیوتیک‌های دیگر از قبیل

لینزولید، ماکرولیدها، وانکومایسین و تنکوپلاتین را افزایش می‌دهد (۳-۶).

اسانس *Citrus aurantifolia* (لیمو) از خانواده روتاسه اثر عمیقی روی سلامت سلول‌های پوست از آن جمله جلوگیری از ظهور تغییرات سلولی در جهت سرطانی شدن و همچنین تأخیر پیری سلول‌ها دارد. همچنین دارای اثرات خنک‌کنندگی بر روی پوست می‌باشد. اسانس لیمو دارای خاصیت ضدانگلی روی کرم‌های مختلف می‌باشد. بوی مطبوع اسانس لیموترش، به وجود سیترال مربوط است. این اسانس دارای اثر ضدباکتریایی قابل‌ملاحظه‌ای بر روی باکتری‌های متعلق به جنس‌های باسیلوس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشیشیاکلی، گونه‌های سالمونلا و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد. همچنین این اسانس دارای طیف وسیعی از فعالیت ضد میکروبی در مقابل قارچ‌ها و مخمرهاست. اسانس *Citrus aurantifolia* خصوصیت آنتی‌سپتیک خوبی برای ضد عفونی کردن آب آلوده دارد. از شیر تازه این گیاه در طب سنتی برای ضد عفونی کردن آب‌های آلوده استفاده می‌شود (۷). اثرات این اسانس بر روی تعدادی از باکتری از جمله استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین قبلاً نشان داده شده است و همچنین دارای اثر ضد التهابی و ضد ویروسی به‌ویژه در مقابل هرپس سیمپلکس و ویروس‌های تیپ ۱ و ۲ می‌باشد. لیمون به‌عنوان جزء اصلی این اسانس از رشد و تکثیر ویروس HIV-1 ممانعت می‌کند (۷).

هدف از پژوهش حاضر بررسی اثرات هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک فسفومایسین و اسانس گیاه *Citrus aurantifolia* بر روی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس ارئوس می‌باشد. در صورت تأیید اثرات هم‌افزایی این دو در شرایط آزمایشگاهی، می‌توان کاربرد موضعی این ترکیبات را در شرایط *in vivo* ارزیابی کرد.

**مواد و روش‌ها**

جمع‌آوری ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین:

۲۳ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین موجود در کلکسیون میکروبی، گروه میکروبی‌شناسی دانشکده پزشکی که از نمونه‌های بالینی ارسالی به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی بیمارستان‌های آموزشی-درمانی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه در فاصله زمانی تیرماه تا آذرماه ۱۳۹۰ جمع‌آوری شده بودند و با تست استاندارد آزمایشگاهی به‌عنوان استافیلوکوکوس مقاوم به متی‌سیلین تعیین هویت شده بودند، وارد مطالعه شدند.

به منظور بررسی اثرات سینترژیستیک فسفومایسین و اسانس *Citrus aurantifolia* غلظت‌های مختلفی از اسانس به محیط کشت نوترینت برات با روش رقیق‌سازی متوالی اضافه شد. سپس غلظت تحت MBC (غلظت بلافاصله کمتر از غلظتی که می‌تواند باکتری را بکشد) از فسفومایسین به کلیه لوله‌ها اضافه شد. کلیه رقت‌ها با  $10^6 \times 1/5$  عدد باکتری تلقیح شده و در طول شب در  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از طی زمان کافی MBC آنتی‌بیوتیک در حضور اسانس با روش ذکر شده تعیین شد (۸).

### یافته‌ها

جداسازی ایزوله‌های مقاوم به اگزاسیلین استافیلوکوکوس ارئوس:

ایزوله‌های مقاوم به اگزاسیلین با فراوانی بیشتر به ترتیب از نمونه‌های زخم (۴۷٫۸ درصد)، ترشحات (واژن، پستان، چشم، درون شکم) (۳۰٫۴ درصد)، خون (۱۳ درصد) و مایع صفاق (۸٫۶ درصد) به دست آمدند.

نتایج تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشنده فسفومایسین:

از ۲۳ ایزوله مقاوم به اگزاسیلین (متی‌سیلین) ۳ ایزوله (۱۳ درصد) نسبت به تمامی غلظت‌های مورد مطالعه از فسفومایسین حساس و ۲ ایزوله (۸٫۷ درصد) مقاوم بودند. میانگین حداقل غلظت بازدارنده در مورد سایر ایزوله‌های استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) با محاسبه میانگین Mean  $\pm$  SD برابر با  $52/9 \pm 56$  میکروگرم در میلی‌لیتر و میانگین حداقل غلظت کشنده  $42/15 \pm 76/11$  تعیین شد. با در نظر گرفتن اینکه حداقل غلظت بازدارنده آنتی‌بیوتیک برای هر ایزوله استافیلوکوکوس ارئوس کمتر یا مساوی با ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر باشد، ایزوله حساس به فسفومایسین و در صورتی که بیشتر از این مقدار باشد ایزوله مقاوم به آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته می‌شود. بر این اساس، در مجموع  $69/5$  درصد ایزوله‌ها (۱۶ ایزوله) مقاوم به فسفومایسین و  $30/4$  درصد (۷ ایزوله) حساس در نظر گرفته شدند.

نتایج تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشنده اسانس *Citrus aurantifolia*:

در مورد ۱۸ ایزوله مقاوم به اگزاسیلین (متی‌سیلین) که در آزمایش قبلی مقادیر MIC و MBC فسفومایسین برای آن‌ها قابل تعیین بود، حداقل غلظت کشنده اسانس تعیین شد. حداقل غلظت کشنده برای ۳ ایزوله  $10$  درصد نسبت حجمی/حجمی از اسانس، برای ۵ ایزوله  $5$  درصد، برای ۴ ایزوله  $2/5$  درصد، برای ۲

تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشنده فسفومایسین:

رقت‌های متوالی از آنتی‌بیوتیک فسفومایسین (Sigma-Aldrich) در محیط کشت مولر هینتون برات (BBL) در هشت لوله تهیه شد و هر یک از لوله‌ها با تعداد  $10^6 \times 1/5$  عدد باکتری تلقیح شده و لوله‌ها در  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد گرم خانه گذاری شدند. دامنه غلظت آنتی‌بیوتیک برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده و کشنده در حداقل  $25-128$  میکروگرم در میلی‌لیتر انتخاب شد. روز بعد لوله‌ها از نظر رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفته و کمترین غلظتی از آنتی‌بیوتیک که باعث مهار رشد باکتری‌ها شده بود (فقدان کدورت) به عنوان حداقل غلظت بازدارنده (MIC) آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته شد. هم‌چنین از لوله‌های فاقد کدورت پنج میکرولیتر بر روی محیط TSB (Merck) آگار کشت داده شد و حداقل غلظتی که پس از انکوباسیون شبانه مانع تشکیل کلنی باکتری در محیط کشت جامد می‌شد، به عنوان حداقل غلظت کشنده (MBC) در نظر گرفته شد. جهت حصول اطمینان از صحت نتایج، کلیه آزمایشات سه بار تکرار گردید. بر طبق مطالعات قبلی در صورتی که حداقل غلظت بازدارنده آنتی‌بیوتیک برای هر ایزوله استافیلوکوکوس ارئوس کمتر یا مساوی با ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر باشد، ایزوله حساس به فسفومایسین و در صورتی که بیشتر از این مقدار باشد ایزوله مقاوم به آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته می‌شود (۸).

تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشنده اسانس *Citrus aurantifolia*:

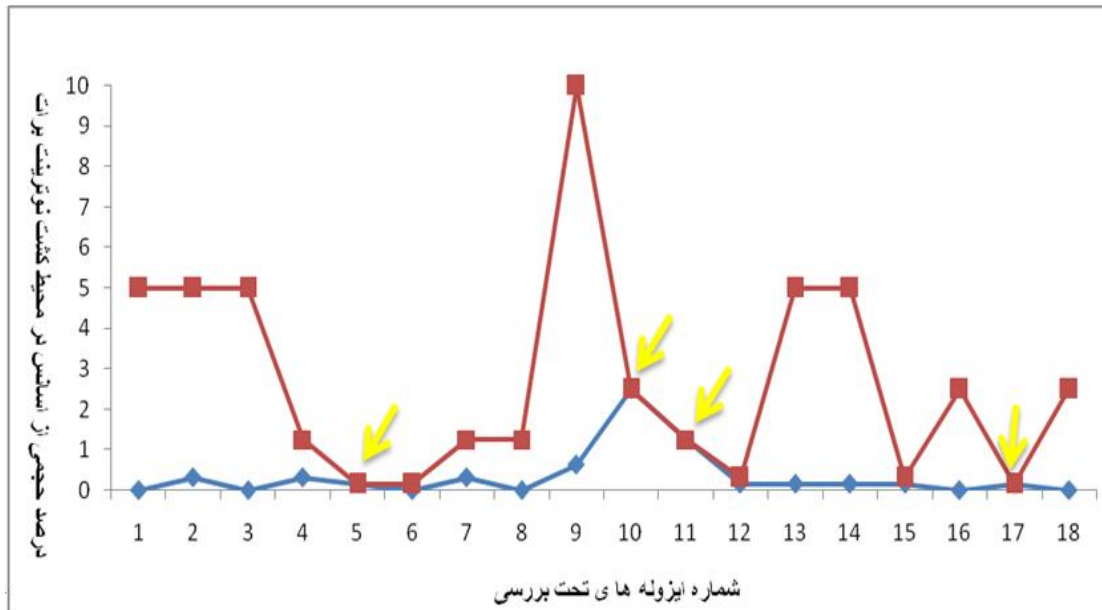
رقت‌های متوالی از غلظت  $20$  درصد حجمی اسانس *Citrus aurantifolia* (باریج اسانس) در محیط کشت مولر هینتون برات حاوی  $0/002$  درصد توین  $80$  (Sigma-Aldrich) در هشت لوله در دامنه غلظت  $10\% - 0/078\%$  حجمی از اسانس تهیه شد و هر یک از لوله‌ها با تعداد  $10^6 \times 1/5$  عدد باکتری تلقیح شده و لوله‌ها در  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد گرم خانه گذاری شدند. با توجه به این که اضافه نمودن اسانس خود باعث ایجاد کدورت در محیط کشت می‌شد، لذا تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) اسانس با بررسی کدورت ممکن نشد. بنابراین از کلیه لوله‌های تحت بررسی پنج میکرولیتر بر روی محیط TSB آگار کشت داده شد و حداقل رقتی که پس از انکوباسیون شبانه مانع تشکیل کلنی باکتری در محیط کشت جامد می‌شد، به عنوان حداقل غلظت کشنده (MBC) در نظر گرفته شد. جهت حصول اطمینان از صحت نتایج، کلیه آزمایشات سه بار تکرار گردید (۸).

تعیین اثر هم‌افزایی اسانس *Citrus aurantifolia* و آنتی‌بیوتیک فسفومایسین:

تعیین اثر هم‌افزایی اسانس *Citrus aurantifolia* و آنتی‌بیوتیک فسفومایسین:

از ۲۳ ایزوله مقاوم به متی‌سیلین ۵ ایزوله برای تعیین اثر سینرژیسم مورد بررسی قرار نگرفتند. از ۱۸ ایزوله مورد بررسی حالت سینرژیسم در ۱۴ ایزوله (۷۷٪) مشاهده شد و در مورد ۴ ایزوله دیگر (۲۳٪) تأثیر سینرژیستیک اسانس و دارو به اثبات نرسید (نمودار ۱).

ایزوله ۰/۳۱۲ درصد و برای ۴ ایزوله ۰/۱۵۶ درصد بوده و در مورد هیچ‌یک از ایزوله‌ها ۰/۶۲۵ درصد نبود. میانگین حداقل غلظت بازدارنده در مورد ایزوله‌های استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) به دلیل ایجاد کدورت پس از اضافه کردن اسانس به لوله‌های آزمایش تعیین نشد. میانگین حداقل غلظت کشنده اسانس در مورد کلیه ایزوله‌ها با محاسبه  $\pm$  SD برابر با ۰/۴٪ $\pm$ ۰/۳ تعیین شد.



**نمودار (۱):** مقایسه اثرات سینرژیستیک اسانس *Citrus aurantifolia* در حضور غلظت‌های تحت MBC از آنتی‌بیوتیک فسفومایسین (منحنی آبی‌رنگ) در مقایسه با اثرات اسانس به‌تنهایی (منحنی قرمز رنگ) هم‌چنان‌که مشاهده می‌شود، در مورد ۴ ایزوله تحت مطالعه (۵ و ۱۰ و ۱۱ و ۱۷) اثرات سینرژیستیک بین اسانس و آنتی‌بیوتیک مشاهده نشد.

## بحث

روی ۶۹ ایزوله استافیلوکوکوس ارئوس و ۱۰۰ ایزوله استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متی‌سیلین کار کردند و حساسیت تمامی آن‌ها نسبت به فسفومایسین را نشان دادند (۹،۱۰). ولی نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد که در مجموع ۶۹/۵ درصد ایزوله‌ها (۱۶ ایزوله) مقاوم به فسفومایسین و ۳۰/۴ درصد (۷ ایزوله) حساس بودند.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ توسط جعفری و همکاران انجام شد ترکیب شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی اسانس *Citrus aurantifolia* بر روی باکتری‌های بیماری‌زای منتقله از غذا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان‌دهنده حضور بیش از ۵۰ ترکیب شیمیایی مختلف در این اسانس با استفاده از روش GC-MS کروماتوگرافی بود.  $\alpha$ -terpineol و  $\gamma$ -terpinen با مقادیر بیشتری نسبت به سایر ترکیبات در این اسانس حضور داشتند. اسانس فوق اثرات ضد باکتریایی قابل‌ملاحظه‌ای بر

مطالعات قبلی تأثیر قابل‌توجه فسفومایسین را بر روی کوکسی‌های گرم مثبت از قبیل استافیلوکوکوس‌های حساس به متی‌سیلین، استرپتوکوکوس پنومونیه مقاوم به سفالوسپورین و پنی‌سیلین، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و گونه‌های انتروکوکوس حتی سویه‌های مقاوم به وانکومایسین را نشان داده است (۹-۱۱). از طرفی این آنتی‌بیوتیک از راه‌های مختلف از قبیل خوراکی و تزریقی قابل تجویز بوده و علاوه بر تأثیر ضد باکتریایی، با مهار تولید سیتوکاین‌های پیش‌برنده التهاب اثر تنظیم‌کنندگی بر عمل کرد نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها را از خود نشان می‌دهد. این آنتی‌بیوتیک پس از تجویز، به‌خوبی به بافت‌های مختلف بدن نفوذ کرده و در درمان انواع مختلفی از عفونت‌های موضعی و سیستمیک کاربرد دارد. در سال ۲۰۱۱ Shittu و همکاران و در همین سال Ching-Lan Lu و همکاران به‌ترتیب بر

برخوردار بود و نیز کاندیدا آلبیکنس به کلیه ترکیبات تحت آزمایش حساس بود، به طوری که حداقل غلظت مهارکننده رشد ترکیبات برای آن‌ها در دامنه 256mg/ml-512mg/ml قرار داشت. حداقل غلظت مهارکننده رشد ترکیبات برای باکتری‌های گرم منفی در دامنه 64mg/ml-512mg/ml قرار داشت (۷). در مطالعه حاضر نیز اسانس *Citrus aurantifolia* در غلظت‌های مختلف از اثرات ضد باکتریایی بر روی کلیه ایزوله‌های تحت آزمایش برخوردار بود. ولی از محدودیت‌های این پژوهش می‌توان به عدم امکان تعیین فعالیت سینرژیستیک اسانس و آنتی‌بیوتیک در مورد ایزوله‌های کاملاً مقاوم یا کاملاً حساس به آنتی‌بیوتیک فسفومایسین اشاره نمود (۵ ایزوله).

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان با انجام مطالعات بیشتر و تکمیلی کاربرد همزمان این دو ترکیب را لافل به عنوان مواد ضد میکروبی در فرمولاسیون ترکیبات موضعی پیشنهاد نمود.

روی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و باسیلوس سوبتیلیس نشان داد. به طوری که با غلظت ۴ و ۸ میکروگرم در هر دیسک به ترتیب باعث مهار رشد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و باسیلوس سوبتیلیس می‌شد. نتایج این مطالعه نشان دهنده اثرات ضد میکروبی قابل توجه این اسانس بود و در نهایت استفاده از اسانس جهت پیشگیری و کاهش احتمال فساد مواد غذایی پیشنهاد شد (۱۱).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ توسط Aibinu و همکاران گزارش شد، اثرات *Citrus aurantifolia* در شکل‌های مختلف (آب‌میوه، اسانس و... در حلال‌های مختلف بر روی انواع مختلفی از باکتری‌ها بررسی شد. باکتری‌های بی‌هوازی و باکتری‌های گرم مثبت نسبت به کلیه ترکیبات استفاده شده حساس بودند، به طوری که حداقل غلظت مهارکننده رشد ترکیبات برای آن‌ها در دامنه 32mg/ml-128g/ml قرار داشت. در مورد قارچ‌ها اسانس از اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای فقط بر روی آسپریژیلوس نیجر

## References:

1. Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC. *Diagnostic microbiology*. 12th ed. New York: Mosby company, St. Louis; 2007.
2. Chitsaz M. Evaluation of the rate of methicillin resistance in *S.aureus* strains isolated from patients and their sensitivity to antibiotics. *Danshvar*. 2005; 61.
3. Barbosa MD, Yang G, Fang J, Kurilla MG, Pompliano DL. Development of a whole-cell assay for peptidoglycan biosynthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(4):943-6.
4. Van Heijenoort J. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* 2001;11(3):25R – 36R.
5. El Zoeiby A, Sanschagrin F, Levesque RC. Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Mol Microbiol* 2003; 47(1):1-12.
6. Kahan FM, Kahan JS, Cassidy PJ, Kropp H. The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Ann N Y Acad Sci* 1974; 235: 364-86.
7. Aibinu I, Adenipekun T, Adelowotan T, Ogunsanya T, Odugbemi T. Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of *Citrus aurantifolia* (Lime fruit) as used locally. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2006;4(2):185-90.
8. HosseiniJazani N, hadizadeh O, Farzaneh H, Moloudizargari M. Synergistic antibacterial effects of  $\beta$ -Chloro-L-alanine and phosphomycin on urinary tract isolates of *E. coli*. *Biol J Micro* 2013; 1 (4):1-6. (persian)
9. Shittu AO, Lin J. Antimicrobial susceptibility patterns and characterization of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in KwaZulu-Natal province, South Africa. *BMC Infect Dis* 2006; 28(6):125-9.
10. Lu CL, Liu CY, Huang UT, Liao CH, Teng LJ, Turnidge JD, Hsueh PR. Antimicrobial Susceptibilities of Commonly Encountered Bacterial Isolates to Fosfomycin Determined by Agar Dilution and Disk Diffusion Methods. *Antimicrobial Agen Chem* 2011;55(9): 4295-301.

11. Jafari S, Esfahani S, Fazeli MR, Jamalifar H, Samadi M, Samadi N, et al. Antimicrobial Activity of Lime Essential Oil Against Food-borne Pathogens Isolated from Cream-filled Cakes and Pastries, Antimicrobial Activity of Lime Essential Oil Against Food-borne Pathogens Isolated from Cream-filled Cakes and Pastries. Int J Biological Chem 2011; 5: 258-65.

## EVALUATION OF THE SYNERGISTIC EFFECT OF PHOSPHOMYCIN AND CITRUS AURANTIFOLIA'S ESSENTIAL OIL ON METHICILLIN RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATES

Bafrin Zahedi<sup>1</sup>, Javid Eghbal<sup>2</sup>, Minoo Zartoshti<sup>3</sup>, Nima Hosseini Jazani<sup>4\*</sup>

Received: 15 Mar, 2015; Accepted: 10 May, 2015

### Abstract

**Background & Aims:** *Staphylococcus aureus* is a gram-positive cocci bacterium that can cause a range of infections. Methicillin resistance in these bacteria is often in companion with resistance to multiple antibiotics. High prevalence of these isolates can cause treatment failure. Phosphomycin is a peptidoglycan biosynthesis inhibitor that is used in treating infections caused by multi-drug resistant bacteria. The antimicrobial effects of *Citrus aurantifolia*'s essential oil on methicillin resistant *S. aureus* have been shown previously. The aim of this study was to evaluate the synergistic effect of sub-MBC doses of Phosphomycin with *Citrus aurantifolia*'s essential oil against methicillin-resistant *S. aureus* isolates.

**Materials & Methods:** In this study, 23 clinical isolates of methicillin-resistant *S. aureus* were collected from clinical samples and these isolates were identified based on biochemical methods. Susceptibility of isolates to different antibiotics was tested by disk diffusion method. In order to determine the minimum inhibitory and bactericidal concentrations of phosphomycin and *Citrus aurantifolia*'s essential oil, serial dilutions of antibiotic and essential oil were prepared in broth medium in concentrations ranging between 0.25-128mg/L and 0.078 - 1%, respectively. The amounts of minimum bactericidal concentrations for a mixture of dilutions of essential oil with sub-MIC doses of Phosphomycin were also determined.

**Results:** Among 23 methicillin resistant isolates, 13% were sensitive to all investigated concentrations of phosphomycin and 87 % were resistant. The average amounts of minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations for the other isolates were  $56 \pm 52.9$  and  $76.11 \pm 42.15$   $\mu$ /ml, respectively. The average amounts of minimum bactericidal concentrations for the *Citrus aurantifolia*'s essential oil was  $3\% \pm 4\%$ . Synergism has been shown in 77% of investigated isolates but not about other 23% of isolates.

**Conclusion:** Due to the higher resistance of isolates tested in this study in comparison with others, it seems that there is a need for exact evaluation of susceptibility tests and *being cautious* in using of phosphomycin alone. Also regarding to the synergistic effect of phosphomycin and *Citrus aurantifolia*'s essential oil on some methicillin resistant isolates, using the combination of them is advised as an effective antimicrobial agent.

**Keywords:** *S. aureus*, phosphomycin, Minimum inhibitory concentration, Minimum bactericidal concentration, *Citrus aurantifolia*'s essential oil

**Address:** Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

**Tel:** +989143464234

**Email:** n\_jazani@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2015; 26(4): 333 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup>M.Sc. Student of Microbiology, Department of Biology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran

<sup>2</sup>Assistant Professor, Department of Paramedical Sciences, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran

<sup>3</sup>Microbiology Lab Technician, Department Of Microbiology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

<sup>4</sup>Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding author)