

## ارزیابی اثر توأم آنتی‌بیوتیک فسفومایسین و اسانس آویشن بر روی جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس

مینو زردشتی<sup>۱</sup>، ملاح احمدی<sup>۲</sup>، نیما حسینی جزئی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت 1394/01/23 تاریخ پذیرش 1394/03/19

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** اغلب جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین نسبت به بسیاری از دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها نیز مقاوم می‌باشند و به دلیل مقاومت دارویی چندگانه می‌توانند عامل عفونت‌های صعب‌العلاج باشند. پایش و کنترل این جدایه‌های مقاوم یک ضرورت همیشگی است. فسفومایسین آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیفی است که ساخت پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری را مهار می‌کند و در کنترل عفونت ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مفید است. به دلیل گسترش توانایی این باکتری در ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و قابلیت سازگاری و بقا در محیط‌های حاوی آنتی‌بیوتیک انجام مطالعات به‌منظور یافتن مواد طبیعی برخوردار از خواص ضد میکروبی، جهت استفاده در درمان عفونت‌های استافیلوکوکی ضروری است. آویشن دارای اثرات ضد میکروبی بوده و تأثیر آن به روی استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین قبلاً نشان داده شده است. در مطالعه حاضر کاربرد توأم فسفومایسین و اسانس آویشن در تشدید اثر ضد میکروبی یکدیگر در شرایط آزمایشگاهی بر روی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش کار:** ۴۶ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از نمونه‌های بالینی با منبع انسانی و دامی جدا گردید. مقادیر حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشنده آنتی‌بیوتیک فسفومایسین از طریق رقیق‌سازی متوالی آنتی‌بیوتیک در محیط کشت مایع در دامنه غلظتی حداقل ۱-۱۲۸ میکروگرم / در میلی‌لیتر برای هر جدایه تعیین گردید. حداقل غلظت کشنده اسانس آویشن با افزودن مقادیر حجمی مختلفی از اسانس در دامنه غلظت ۱۰ الی ۰/۰۷۸ درصد در محیط کشت مایع به دست آمد. برای سنجش تأثیر توأم آنتی‌بیوتیک و اسانس نیز غلظت‌های مختلف اسانس آویشن در محیط کشت مولر هینتون براث تهیه گردید و سپس غلظت تحت حداقل غلظت کشنده از فسفومایسین به لوله‌ها اضافه شد. کلیه رقت‌ها با  $10^6 \times 1/5$  باکتری تلقیح شد و در طول شب در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. بدین ترتیب حداقل غلظت کشنده آنتی‌بیوتیک در حضور اسانس تعیین شد.

**یافته‌ها:** از ۴۶ جدایه مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس ۱۵ درصد نسبت به تمامی غلظت‌های مورد مطالعه از فسفومایسین حساس و ۲ درصد مقاوم بودند، در کل ۴۳/۵ درصد جدایه‌ها مقاوم و ۵۶/۵ درصد جدایه حساس نسبت به فسفومایسین در نظر گرفته شد. جدایه‌ها به غلظت‌های مختلفی از اسانس آویشن حساس بودند. در بررسی اثر هم‌افزایی بین آنتی‌بیوتیک فسفومایسین و اسانس آویشن، در ۹۷/۴ درصد از جدایه‌ها اثر هم‌افزایی مشاهده شد.

**بحث:** با توجه به اثر ضد میکروبی اسانس آویشن بر روی جدایه‌های تحت بررسی در مطالعه حاضر و با توجه به خاصیت هم‌افزایی اسانس آویشن و آنتی‌بیوتیک فسفومایسین بر روی اکثر جدایه‌های مقاوم استافیلوکوکوس اورئوس، می‌توان با انجام مطالعات بیشتر و تکمیلی، کاربرد هم‌زمان این دو ترکیب را حداقل به‌عنوان مواد ضد میکروبی در فرمولاسیون ترکیبات موضعی پیشنهاد نمود.

**واژه‌های کلیدی:** استافیلوکوکوس اورئوس، فسفومایسین، اسانس آویشن، اثرات ضد میکروبی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و ششم، شماره پنجم، ص 387-380، مرداد 1394

آدرس مکاتبه: ارومیه، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، تلفن: ۰۹۱۴۳۴۰۶۴۱۰

Email: m.ahmadi@urmia.ac.ir

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

<sup>۲</sup> دانشیار میکروبی‌شناسی، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)

<sup>۳</sup> استاد میکروبی‌شناسی، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

## مقدمه

استافیلوکوک‌ها کوکسی‌های گرم مثبتی هستند که شبیه خوشه انگور آرایش می‌یابند. از میان گونه‌های مختلف آن، سه گونه اورئوس، اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس از اهمیت بالینی بیشتری برخوردارند. استافیلوکوکوس اورئوس بیماری‌زاترین گونه استافیلوکوک است که به واسطه تولید آنزیم کوآگولاز شناسایی شده و با توجه به توکسین‌ها و فاکتورهای خارج سلولی متعددی که دارد به شدت پاتوژن است. این باکتری قادر به ایجاد اشکال مختلفی از بیماری‌ها از قبیل مسمومیت غذایی و باکتری‌های خطرناک منجر شونده به عفونت‌های موضعی از قبیل اندوکاردیت، مننژیت، استئومیلیت حاد و آبسه‌های منتشر در تمام اعضا می‌باشد. این باکتری تنوع ژنتیکی قابل توجهی برای مقاومت نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها را داشته و بسیاری از جدایه‌های این باکتری به دلیل مقاومت نسبت به انواع مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها باعث ایجاد عفونت‌های وخیم بیمارستانی می‌شوند. بروز و شیوع عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از مشکلات مهم سیستم‌های درمانی در سرتاسر دنیا محسوب می‌شود (۱،۲).

مشاهده سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، در طول مدت یک سال که تازه از معرفی متی‌سیلین در سال ۱۹۶۱ گذشته بود از بین نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های اروپایی گزارش شد. اکنون این سویه‌های مقاوم در تمام نقاط دنیا پخش شده است. بر طبق گزارشات موجود فراوانی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در کشورهای آسیای شرقی نظیر چین، کره و تایوان بیش از ۷۰ درصد، در امریکای شمالی بیش از ۵۰ درصد، در اروپا ۲۰ درصد و در ایران حدود ۵۰ درصد می‌باشد. متی‌سیلین، یک آنتی‌بیوتیک از خانواده پنی‌سیلین‌ها است که به صورت نیمه مصنوعی ساخته شده و نسبت به آنزیم‌های پنی‌سیلیناز مقاوم است. مقاومت به وجود آمده نسبت به متی‌سیلین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از طریق تولید یک پروتئین اختصاصی اتصالی به پنی‌سیلین به نام PBP2a<sup>۱</sup> است که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی تمایل اتصالی بسیار ضعیفی دارد. پروتئین PBP2a<sup>۱</sup> ژن *mecA* رمزگذاری می‌شود و معلوم شده که این ژن روی عناصر ژنتیکی متحرکی به نام SCCmec<sup>۲</sup> قرار دارد و در کروموزوم سویه‌های مقاوم وجود دارد.

بیمارانی که با MRSA<sup>۳</sup> عفونت پیدا می‌کنند نسبت به آن‌هایی که با MSSA<sup>۴</sup> عفونی می‌شوند مدت طولانی‌تری در بیمارستان‌ها بستری می‌شوند که این امر باعث می‌گردد، عفونت آن‌ها بیشتر به سوی باکتری‌می یا آندوکاردیت پیشرفت کند و عوارض حاصل از عفونت، نظیر نارسایی کلیوی نیز در آن‌ها بیشتر اتفاق می‌افتد. میزان مرگ‌ومیر در بین بیماران با عفونت MRSA به طور معنی‌داری بیش از بیماران با عفونت MSSA است (۳).

فسفومایسین یکی از آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر بیوسنتز پپتیدوگلیکان باکتریایی است که با مهار یکی از مراحل ابتدایی ساخت پپتیدوگلیکان، از ساخته شدن استیل مورامیک اسید و نهایتاً پپتیدوگلیکان جلوگیری کرده و باعث حساس شدن باکتری به فشار اسمزی و لیزسولی در شرایط طبیعی می‌شود، فسفومایسین یک آنتی‌بیوتیک وسیع الطیف بوده که در کنترل عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم و نیز حساس به متی‌سیلین کارا می‌باشد هم‌چنین کاربرد توأم فسفومایسین همراه با آنتی‌بیوتیک‌های دیگر باعث افزایش کارایی آن‌ها شده است (۴-۶).

آویشن یکی از گیاهان خانواده نعناع می‌باشد که در ایران، افغانستان و پاکستان به طور بومی رشد می‌کند و از خواص آنتی‌سپتیک، ضداسپاسم و ضدالتهاب برخوردار است. آویشن برای تقویت اعصاب، درمان افسردگی، خستگی و بی‌خوابی مفید بوده و همچنین نشاط‌آور است. این گیاه دارای خاصیت ضد میکروبی، ضد قارچی و ضد انگلی بوده و مصرف آن به صورت جوشانده برای رفع تنگی نفس، برونشیت، سرفه، ناهنجاری‌های گوارشی، سیاه‌سرفه، سرگیجه، سردرد و زکام پیشنهاد می‌شود (۷). آویشن دارای اثرات ضد میکروبی می‌باشد که این اثر به حضور ترکیبات فنلی در اسانس آویشن مربوط است. هرچقدر مقدار مواد فنولی در اسانس بالاتر باشد، خواص ضد میکروبی اسانس بیشتر خواهد بود. این مواد شامل کارواکرول، اوژنول، پاراسیمول و تیمول می‌باشند. آویشن در درمان بیماری‌های عفونی مؤثر بوده و تأثیرات آن روی استافیلوکوک‌های مقاوم به اثبات رسیده است (۸-۱۰).

هدف از پژوهش حاضر بررسی اثرات آنتی‌بیوتیک فسفومایسین و اسانس آویشن به صورت توأم بر روی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین می‌باشد تا احتمالاً با مشاهده تأثیرات مثبت استفاده توأم از این دو ترکیب، بتوان از مقادیر مناسب آن‌ها به منظور تولید ترکیبات مؤثر آنتی‌سپتیک استفاده کرد.

<sup>۳</sup> Methicillin Resistant Staphylococcus aureus

<sup>۴</sup> Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus

<sup>۱</sup> Penicillin Binding Protein 2a

<sup>۲</sup> Staphylococcal Cassette Chromosome mec

## مواد و روش‌ها

الف - جمع‌آوری نمونه:

جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به‌دست‌آمده از نمونه‌های حیوانی و انسانی که جمع‌آوری شده بود، در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌های حیوانی در فاصله زمانی خردادماه ۱۳۸۹ تا مردادماه ۱۳۹۱ از پوست ناحیه اطراف دهان سگ جداسازی گردید. جدایه‌های انسانی در فاصله زمانی تیرماه تا آذرماه ۱۳۹۰ از نمونه‌های زخم و ترشحات بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های آموزشی درمانی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه جداسازی شد. تعیین هویت جدایه‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد شامل رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، رشد در محیط مانیتول سالت آگار، DNase و گواکولاز لامی و لوله‌ای انجام شد. برای تعیین مقاومت جدایه‌ها نسبت به متی‌سیلین از روش تعیین حساسیت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین استفاده شد. به این منظور نوارهای حاوی شیب غلظتی اگزاسیلین (در دامنه غلظت ۰/۱۵ تا ۲۵۶ میکروگرم) (HiComb) (Himedia, India) طبق دستورالعمل شرکت سازنده مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا باکتری با روش کشت چمنی در سطح پلیت حاوی محیط مولر هینتون آگار (Merck-Germany) کشت داده شد. پس از ۵ الی ۱۵ دقیقه نگهداری در دمای آزمایشگاه، نوار اگزاسیلین در سطح محیط کشت جامد حاوی جدایه تحت بررسی قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حداقل غلظت بازدارنده آنتی‌بیوتیک با مشاهده هاله عدم رشد بیضی‌شکل قرائت گردید و ۴۶ جدایه مقاوم به اگزاسیلین از بین نمونه‌های موجود جهت انجام آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند (۱۱، ۱۲).

ب - تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشنده فسفوماپسین:

حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشنده فسفوماپسین در مورد جدایه‌های تحت مطالعه تعیین شد. به‌طور خلاصه رقت‌های دو برابر از آنتی‌بیوتیک فسفوماپسین در دامنه ۱ - ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر در محیط کشت مولر هینتون برات در هشت لوله‌آزمایش تهیه و با  $1/5 \times 10^6$  CFU/ml باکتری تلقیح گردید. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، لوله‌ها از نظر کدورت به‌طور چشمی مورد بررسی قرار گرفته و کمترین رقتی که باعث مهار رشد باکتری شود (فقدان کدورت) به‌عنوان حداقل غلظت بازدارنده رشد MIC<sup>۵</sup> در مورد هر جدایه تعیین شد. از لوله‌های فاقد کدورت پنج میکرولیتر روی محیط TSA (Scharlau Chemie) کشت داده شد. حداقل رقتی که

پس از گرمخانه گذاری شبانه مانع تشکیل کلنی باکتری در محیط کشت جامد می‌شد به‌عنوان حداقل رقت کشنده MBC<sup>۶</sup> در نظر گرفته شد. بر طبق مطالعات قبلی اگر حداقل غلظت بازدارنده آنتی‌بیوتیک برای هر جدایه استافیلوکوکوس اورئوس کمتر یا مساوی ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر باشد جدایه حساس و بیشتر از این مقدار مقاوم در نظر گرفته می‌شود (۱۳، ۱۴).

ج - تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشنده اسانس آویشن:

برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشنده اسانس آویشن (باریج اسانس - ایران) از رقت‌های متوالی از غلظت ۲۰ درصد حجمی اسانس آویشن در محیط کشت مولر هینتون برات حاوی ۰/۰۲ درصد توئین ۸۰ (Merck) (به‌منظور افزایش حلالیت اسانس روغنی) استفاده شد. بدین ترتیب که در هشت لوله غلظت‌های متوالی دو برابر از اسانس در دامنه غلظت ۱۰-۰/۰۷۸ درصد حجمی/حجمی از اسانس در محیط کشت تهیه شد. هر یک از لوله‌ها با  $1/5 \times 10^6$  CFU/ml باکتری تلقیح و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. چون افزودن اسانس خود باعث ایجاد کدورت در محیط کشت می‌شد حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) اسانس با بررسی کدورت امکان‌پذیر نشد، بنابراین از کلیه لوله‌های تحت بررسی پنج میکرولیتر روی محیط کشت جامد کشت داده شد و حداقل رقت کشنده (MBC) اسانس آویشن تعیین گردید (۹، ۱۰).

د- بررسی اثرات ضد باکتریایی توأم فسفوماپسین و اسانس آویشن:

به‌منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی توأم فسفوماپسین و اسانس آویشن غلظت‌های مختلفی از اسانس به محیط کشت مولر هینتون برات حاوی ۰/۰۲ درصد توئین ۸۰ با روش رقیق‌سازی متوالی دو برابر اضافه شد و در نهایت غلظت‌های مختلف اسانس آویشن در حجم یک میلی‌لیتر تهیه گردید، سپس یک میلی‌لیتر از غلظت تحت MBC (غلظت بلافاصله کمتر از غلظتی که می‌تواند باکتری را بکشد) از آنتی‌بیوتیک فسفوماپسین به کلیه لوله‌ها اضافه شد. کلیه رقت‌ها با  $1/5 \times 10^6$  CFU/ml باکتری تلقیح شد و در طول شب در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. پس از طی زمان کافی MBC آنتی‌بیوتیک در حضور غلظت‌های متفاوت اسانس آویشن تعیین گردید.

## یافته‌ها

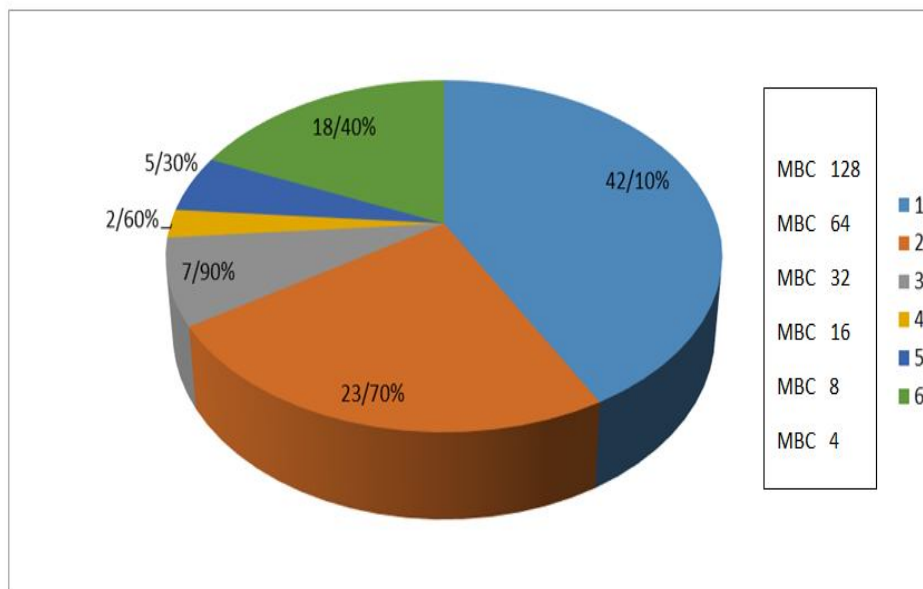
<sup>۶</sup> Minimal bactericidal concentration

<sup>۵</sup> Minimal inhibition of concentration

از بین ۴۶ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین که مورد بررسی قرار گرفت هفت جدایه به دلیل حساسیت کامل به فسفومایسین و یک جدایه به دلیل مقاومت کامل نسبت به همه غلظت‌های تحت بررسی از آنتی‌بیوتیک فسفومایسین برای تعیین اثر توأم آنتی‌بیوتیک و اسانس از محدوده مطالعه خارج شدند.

در این مطالعه برای ۳۸ جدایه با استفاده از رقت‌های مورد استفاده از آنتی‌بیوتیک، تعیین حداقل غلظت کشنده ممکن شد. بطوریکه حداقل غلظت کشندگی ۱۶ جدایه (۴۲/۱ درصد) معادل ۱۲۸ میکروگرم/ میلی‌لیتر، نه جدایه (۲۳/۷ درصد) برابر ۶۴ میکروگرم/ میلی‌لیتر، سه جدایه (۷/۹ درصد) برابر ۳۲ میکروگرم/ میلی‌لیتر، یک جدایه (۲/۶ درصد) برابر ۱۶ میکروگرم/ میلی‌لیتر، دو جدایه (۵/۳ درصد) ۸ برابر میکروگرم/ میلی‌لیتر و هفت جدایه (۱۸/۴ درصد) برابر ۴ میکروگرم/ لیتر بود (نمودار ۱).

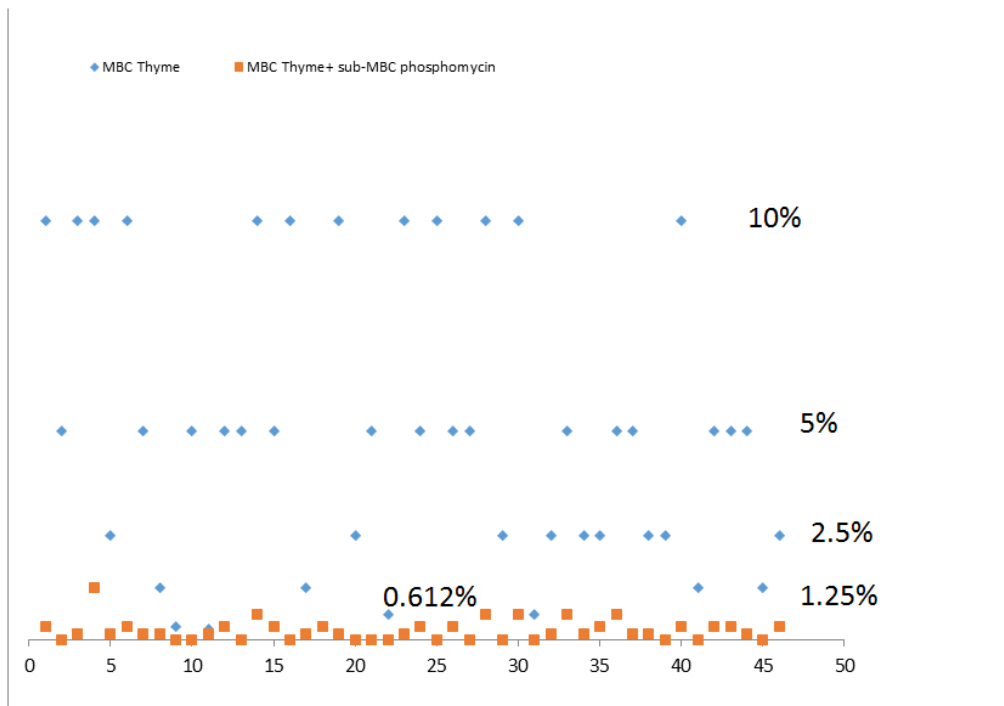
در این مطالعه از جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به‌دست‌آمده از نمونه‌های بالینی ۴۶ جدایه مقاوم به متی‌سیلین شامل ۲۳ جدایه از منبع انسانی و ۲۳ جدایه از منبع حیوانی در پژوهش جهت تعیین میزان حساسیت آن‌ها نسبت به فسفومایسین استفاده شد. از ۴۶ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین هفت جدایه (۱۵ درصد) نسبت به تمامی غلظت‌های مورد مطالعه از فسفومایسین حساس و یک جدایه (۲ درصد) مقاوم بودند. با در نظر گرفتن اینکه اگر حداقل غلظت بازدارنده آنتی‌بیوتیک فسفومایسین برای هر جدایه استافیلوکوکوس اورئوس کمتر یا مساوی با ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر باشد، جدایه حساس به فسفومایسین و در صورتی که بیشتر از این مقدار باشد جدایه مقاوم به فسفومایسین در نظر گرفته می‌شود، بنابراین در مجموع ۲۰ جدایه (۴۳/۵ درصد) مقاوم و ۲۶ جدایه (۵۶/۵ درصد) حساس به فسفومایسین در نظر گرفته شدند.



**نمودار (۱):** حداقل غلظت کشنده جدایه‌های انسانی و حیوانی استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی‌بیوتیک فسفومایسین

در بررسی اثر هم‌افزایی فسفومایسین و اسانس آویشن معلوم گردید که از میان ۳۸ جدایه تحت بررسی در این مرحله که در مراحل قبلی حداقل غلظت کشنده فسفومایسین و حداقل غلظت کشنده اسانس آویشن به‌تنهایی برای آن‌ها مشخص شده بود، در مورد ۹۷/۴ درصد از جدایه‌ها اسانس آویشن دارای اثر هم‌افزایی در همراهی با آنتی‌بیوتیک فسفومایسین بود و تنها در ۲/۶ درصد جدایه‌ها اثر هم‌افزایی مشاهده نشد (نمودار ۲).

اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف آویشن به‌تنهایی و توأم با فسفومایسین و مقایسه آن‌ها در نمودار شماره دو آورده شده است. از ۴۶ جدایه مقاوم به اگزاسیلین (متی‌سیلین) حداقل غلظت کشنده اسانس آویشن برای ۱۱ جدایه ۱۰ درصد، برای ۱۵ جدایه ۵ درصد، برای ۱۲ جدایه ۲/۵ درصد، برای چهار جدایه ۱/۲۵ درصد، برای دو جدایه ۰/۶۲۵ درصد و برای دو جدایه ۰/۳۱۲ درصد نسبت حجمی/حجمی از اسانس به دست آمد و در مورد هیچ‌یک از جدایه‌ها ۰/۱۵۲ درصد نبود.



**نمودار (2):** مقادیر حداقل غلظت کشنده اسانس آویشن را به‌تنهایی (نقاط آبی‌رنگ) در مقایسه با مقادیر غلظت کشنده اسانس در حضور غلظت‌های Sub-MBC از آنتی‌بیوتیک فسفومایسین برای هر جدایه (نقاط نارنجی‌رنگ) را نشان می‌دهد. هم‌چنان که مشاهده می‌شود، غلظت کشنده اسانس در حضور آنتی‌بیوتیک به‌شدت کاهش یافته است.

(Thymol)، لینالول (Linalool) و سینئول (Syneol) دارای خواص دارویی ضد میکروبی و ضد باکتریایی و ضد نفخ می‌باشد که از آن به‌عنوان داروی قوی جهت درمان سرماخوردگی استفاده می‌شود (۹).

با توجه به خواص مناسب ضد باکتریایی و فارماکولوژیک فسفومایسین و خواص دارویی و ضد باکتریایی گیاه آویشن که مانند یک آنتی‌بیوتیک طبیعی روی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف اثر می‌کند و با توجه به مقاومت بالای استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های رایج، مطالعه حاضر طراحی گردید.

در سال ۲۰۱۱ میلادی Shittu و همکاران و در همین سال Ching-Lanlu و همکاران با مطالعه به ترتیب بر روی ۶۹ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس و ۱۰۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، حساسیت تمامی نمونه‌ها نسبت به فسفومایسین را نشان دادند. در سال ۱۳۹۳ شمسی حسینی جزئی و همکاران نشان دادند که از ۴۳ ایزوله بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین که از نمونه‌های بالینی انسانی جدا شده بودند مجموعاً ۴۴/۲ درصد جدایه‌ها نسبت به فسفومایسین

هم‌چنین از لحاظ میزان حساسیت نسبت به فسفومایسین، اسانس آویشن و استفاده توأم از فسفومایسین در همراهی با اسانس آویشن بین جدایه‌های حیوانی و انسانی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (P=0.498) (P=0.639) (P=0.737).

## بحث و نتیجه‌گیری

آنتی‌بیوتیک فسفومایسین یک آنتی‌بیوتیک مؤثر و مناسب برای تجویز از راه‌های مختلف است. فسفومایسین پس از تجویز سیستمیک به‌خوبی در بافت‌های مختلف جذب می‌شود و پس از ورود در بدن با غلظت بالا در سرم، کلیه‌ها، دیواره عروق، پروستات، ریه‌ها، استخوان، مایع مغزی نخاعی، قلب و سایر مایعات بدن نفوذ می‌کند. غلظت بالای فسفومایسین در پلاسما و بافت‌های نرم باعث موفقیت زیاد درمان با این دارو شده است و در درمان عفونت‌های موضعی و سیستمیک قابل استفاده می‌باشد (۱۵).

آویشن یکی از شناخته‌شده‌ترین گیاهان دارویی ایران است که در طب سنتی ایران مصرف فراوانی دارد. گیاه آویشن به دلیل داشتن اسانس‌های بسیار قوی و وسیع الطیف ضد میکروبی مثل کارواکرول (Carvacrol)، پاراسیمن (P-cymene)، تیمول

مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشنده آنتی‌بیوتیک فسفومایسین گردید، نشان‌دهنده مقاومت بالای جدایه‌های مورد بررسی نسبت به آنتی‌بیوتیک فسفومایسین بود. چنانکه مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک فسفومایسین به ۴۳/۵ درصد از جدایه‌ها رسیده است و این می‌تواند زنگ خطری برای استفاده از این آنتی‌بیوتیک به‌تنهایی باشد.

در مطالعه حاضر بر روی اسانس آویشن و تأثیر آن بر روی استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین معلوم گردید که اسانس آویشن در غلظت‌های مختلف می‌تواند مانع از رشد استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین شود (نمودار ۲). نقطه قابل‌تأمل در مطالعه پیش رو اثرات هم‌افزایی اسانس آویشن و آنتی‌بیوتیک فسفومایسین است که با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، اثرات هم‌افزایی بین دو ترکیب فوق در ۹۷/۴ درصد جدایه‌های تحت بررسی وجود دارد.

از ۳۸ جدایه مورد بررسی در مورد ۳۷ جدایه (۹۷/۴ درصد) تأثیر هم‌افزایی اسانس و دارو به اثبات رسید و معلوم گردید که با استفاده هم‌زمان از این دو ترکیب می‌توان میزان تأثیر آنتی‌بیوتیک فسفومایسین را روی جدایه‌ها افزایش داده و در غلظت‌های تحت کشندگی آنتی‌بیوتیک فسفومایسین نیز همراه با اسانس آویشن اثر کشندگی خوبی را شاهد باشیم در مورد یک جدایه (۲/۶ درصد) اثر هم‌افزایی مشاهده نشد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان با انجام مطالعات بیشتر و تکمیلی کاربرد هم‌زمان این دو ترکیب را به‌عنوان مواد ضد میکروبی حداقل در فرمولاسیون ترکیبات موضعی پیشنهاد نمود.

مقاوم و ۵۵/۸ درصد حساس بودند. این محققین با توجه به مقاومت بالای جدایه‌های تحت بررسی، لزوم کاربرد احتیاط در به‌کارگیری فسفومایسین به‌تنهایی و نیز استفاده توأم از این آنتی‌بیوتیک در کنار سایر ترکیبات ضد میکروبی مؤثر بر استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین را خاطرنشان نمودند (۱۶).

مطالعه‌ای که در سال ۱۳۹۲ شمسی توسط محمدمهدی سلطان دلال انجام‌گرفته نشانگر تأثیر ضد میکروبی اسانس آویشن بر روی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین جداسازی شده از مواد غذایی در شرایط آزمایشگاهی بوده است. این یافته‌ها نشان داد که اسانس آویشن شیرازی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک جداسازی شده از مواد غذایی اثر ضد باکتریایی دارد (۹).

در سال ۱۳۹۱ شمسی محمد حجتی نشان داد که عصاره گیاهانی مانند آویشن از فاسدشدن مواد غذایی جلوگیری می‌کند. او اثر ضد باکتریایی این عصاره را بر استافیلوکوکوس اورئوس که از عوامل مؤثر در فساد مواد غذایی است به روش انتشار ماده ضد میکروبی از دیسک در محیط کشت جامد بررسی کرد و نشان داد که عصاره اثر بازدارندگی بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس دارد (۱۰).

نتایج حاصل از مطالعه پیش رو که اثر آنتی‌بیوتیک فسفومایسین را بر روی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین که از نمونه‌های بالینی انسان و نمونه‌های به‌دست‌آمده از حیوان انجام گرفت و منجر به تعیین حداقل غلظت

## References:

- Xia J, Gao J, Kokudo N, Hasegawa K, Tang W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* antibiotic resistance and virulence. *Biosci Trends* 2013;7(3):113-21.
- Shaffer RK. The challenge of antibiotic-resistant *Staphylococcus*: lessons from hospital nurseries in the mid-20th century. *Yale J Biol Med* 2013; 86(2): 261-70.
- Njarpyrayh Sh, Azimian A, Mostafaei M. Detection of *Staphylococcus aureus* resistance to methicillin by disk diffusion method to determine the MIC and PCR for *mecA* gene. *Modares J Med Sci Pathobiol* 2009; 12 (3): 61-9. (Persian)
- Hiramatsua K, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chem* 1997; 40: 135-6.
- Kahan FM, Kahan JS, Cassidy PJ, Kropp H. The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Ann N Y Acad Sci* 1974; 235: 364-86.
- Tang HJ, Cheng KC, Toh HS, Su BA, Chiang SR, Ko WC, et al., In vitro efficacy of fosfomycin-containing regimens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(4): 944-50.

7. Mardani M, Motamedifar M, Hoseinipour R. A Study of the Antiviral Effect of the Essential oil of *Zataria Multiflora* Boiss on Herpes Simplex Type 1 in Vero Cell Culture. *J Dentistry, Shiraz Univ Med Sci* 2012; supplement: 414-20. (Persian)
8. Noori N, Rokni N, AkhondzadeBasti A, Misaghi A, DabbaghMoghaddam A. The antimicrobial effect of *Zataria multiflora* Boiss essential oil against *E.coli* O157: H7 in minced beef during refrigerated storage as a replacement for chemical preservatives in order to maintain the consumers health. *Ann Mil Health Sci Res* 2012; 10 (3):194-7. (Persian)
9. Soltan Dallal M, Bayat M, Yazdi M. Evaluation of the antimicrobial effect of essential oil of *Thymus vulgaris* on antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from food. *J Kurdistan Univ Med Sci* 1391; 17(2): 21-9. (Persian)
10. Hodjati M. Antimicrobial effect of essential oils on *Staphylococcus aureus* Lamiaceae family National Conference on natural products and medicinal plants. *North Korasan Univ Med Sci*: 2012.
11. Hosseini Jazani 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.
12. Michalopoulos SA, Gougoutas V. The revival of fosfomycin. *Inter J Infect Dis* 2011; 15(11): 732–e739.
13. Miró JM, Entenza JM, Del Río A, Velasco M, Castañeda X, Garcia de la Mària C, et al. High-dose daptomycin plus fosfomycin is safe and effective in treating methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(8):4511–5.
14. Schintler MV1, Traunmüller F, Metzler J, Kreuzwirt G, Spendel S, Mauric O, et al. High fosfomycin concentrations in bone and peripheral soft tissue in diabetic patients presenting with bacterial foot infection. *J Antimicrob Chemothe* r2009; 64(3): 574-8.
15. Shittu A, 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.
16. Hosseini Jazani N, Sharifi Y, Farzaneh H, Zartoshti M. Determination Of The Efficacy Of Phosphomycin On Clinical Isolates Of Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus*. *Urmia Med J* 2014; 25 (10):874-80.

## EVALUATION OF THE EFFECT OF PHOSPHOMYCIN ALONG WITH THYMUS VULGARIS ESSENTIAL OIL ON METHICILLIN RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS

*Minoo Zardoshti<sup>1</sup>, Malahat Ahmadi<sup>2\*</sup>, Nima Hosseini Jazani<sup>3</sup>*

*Received: 12 Apr , 2015; Accepted: 9 June , 2015*

### Abstract

**Background & Aims:** Most of the methicillin resistant *S.aureus* isolates are resistant to many other antibiotics as well, so they can cause refractory infections. Therefore monitoring and control of these resistant isolates is always a necessity. Phosphomycin is an extended-spectrum antibiotic that inhibits synthesis of bacterial cell wall peptidoglycan and is helpful for controlling methicillin resistant *S.aureus* infections. However, because of bacteria's ability of resisting to antibiotics and adaption and survival in antibiotic-containing environments, studies for finding of natural antibacterial compounds for treatment of such infections is essential. Antibacterial effects of thymus vulgaris on Methicillin resistant *S.aureus* has already been shown. In this study the in vitro effects of phosphomycin along with thymus vulgaris essential oil on methicillin resistant *S.aureus* isolates were investigated.

**Materials & Methods:** Forty six Methicillin resistant *S.aureus* isolates from clinical specimens were obtained. Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of phosphomycin was determined by serial dilutions of antibiotic in broth with concentrations ranging between 0.25-125 mg/L for each isolate. Also minimum bactericidal concentration of essential oil was obtained by adding 10-0.078 V/V of it in broth medium. The effect of antibiotic along with essential oil was measured by adding different concentrations of essential oil in Mueller-Hinton broth medium in the presence of sub-MBC doses of antibiotic then by adding  $1/5 \times 10^6$  CFU of each isolate and incubating test tubes overnight in 37° C. Minimum inhibitory concentration of phosphomycin along with thyme essential oil was determined for each isolate.

**Results:** Out of 46 isolates of methicillin-resistant *S.aureus*, 15% were sensitive to all investigated concentrations of phosphomycin and 2% were resistant, in total 43.5% of isolates were considered as resistant and 56.5% as sensitive. Isolates were sensitive to different concentrations of thyme essential oil. Synergism has been observed in 97.4% of isolates between phosphomycin and thyme essential oil, in respect of their antibacterial effects.

**Conclusion:** Regarding to the antimicrobial effects of thyme essential oil and synergistic effect of it with phosphomycin on most of the methicillin resistant isolates, more investigations for using this combination as an effective antimicrobial agent at least in topical antimicrobial formulations is advised.

**Keyword:** Staphylococcus aureus, phosphomycin, Thymus vulgaris essential oil, Antimicrobial effects

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

**Tel:**+989143406410

**E-mail:** m.ahmadi@urmia.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2015; 26(5): 387 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup>M.Sc. Student in Bacteriology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>2</sup>Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)

<sup>3</sup>Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medicine Sciences, Urmia, Iran