مجلـــه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۴، شمـاره‌ی ۱۰۵، مهر و آبان ۱۳۹۵، صفحات ۶۷ تا ۷۷

بررسی اثر مهاری اسانس گیاه آویشن بر روی افلوکس پمپ NorA *استافیلوکوکوس اورئوس*

آرام شریفی[۱]، دکترعبدالمجید محمدزاده[۲]، دکتر پژمان محمودی[۲]، نگار ساسانیان[۳]

نویسنده‌ی مسوول: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان Mohammadzadeh4@hotmail.com

دریافت: ۹۴/۵/۱۰ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: *یکی از دلایل وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها مربوط به فعالیت پمپ‌های افلوکس می‌باشد. یافتن ترکیباتی که توانایی مهار این پمپ‌ها را داشته باشد بسیار حایز اهمیت است. چنین ترکیباتی می‌تواند سبب افزایش حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها و یا بازگشت حساسیت در سویه‌های مقاوم شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر اسانس آویشن دنایی بر روی مهار پمپ NorA باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بود.*

روش بررسی: *ابتدا از برگ‌های گیاه خشک شده آویشن دنایی به روش تقطیر با آب (Hydrodistillation) اسانس گرفته شد. سپس با روش اتیدیوم بروماید-آگار کارت ویل (Ethidium Bromide-Agar Cartwheel Method) میزان پمپ کردن اتیدیوم بروماید و تاثیر اسانس آویشن روی پمپ کردن این ماده توسط باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شد. کمترین غلظت مهارکنندگی اسانس آویشن با روش میکرودایلوشن تعیین گردید. اثر تحت غلظت مهاری ((Sub-Minimum Inhibitory Concentration (Sub-MIC)) اسانس آویشن با آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون با روش میکرودایلوشن اندازه‌گیری شد. میزان پمپ کردن اتیدیوم بروماید، سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین (ترکیبات منتقل شونده توسط NorA) به‌عنوان میزان فعالیت پمپ NorA در نظر گرفته شد.*

یافته‌ها: *روش کارت ویل نشان داد که اسانس آویشن دنایی می‌تواند میزان پمپ کردن اتیدیوم بروماید توسط باکتری را کاهش دهد. در تست Checkerboard اثر تحت غلظت مهاری اسانس آویشن دنایی با اتیدیوم بروماید، سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین به صورت کاملا سینرژیسمی بود.*

نتیجه‌گیری: *اثر سینرژیسمی بین اسانس گیاه آویشن دنایی با بقیه‌ی ترکیبات نشان داد که این اسانس گیاهی می‌تواند باعث افزایش خاصیت ضدباکتریایی آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شود. با توجه به اینکه این آنتی‌بیوتیک‌ها توسط NorA به بیرون پمپ می‌شوند، افزایش حساسیت به این آنتی‌بیوتیک‌ها احتمالا به دلیل مهار فعالیت افلوکس پمپ NorA می‌باشد.*

واژگان کلیدی: *افلوکس پمپ NorA، استافیلوکوکوس اورئوس، آویشن دنایی*

مقدمه

امروزه استفاده‌ی گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث ظهور باکتری‌های بیماری‌زایی شده است که به این آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند. این موضوع به یکی از نگرانی‌های علم پزشکی در حیطه‌ی درمان عفونت‌ها تبدیل شده است؛ به همین خاطر بسیاری از مطالعات در تلاش هستند که جایگزینی برای این آنتی‌بیوتیک‌ها معرفی نمایند (۱). مکانیسم‌های مختلفی جهت

۱- دانشجوی دکترای تخصصی باکتری‌شناسی، دانشکده‌ی پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۲- دکترای تخصصی میکروبیولوژی، استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده‌ی پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

مقاوم شدن یک باکتری به یک آنتی‌بیوتیک وجود دارد که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به این موارد اشاره کرد: ۱- تغییر در مکان هدف دارو (جایگاهی که دارو به آن متصل شده و عمل می‌کند)؛ ۲- ایجاد مکانسیم‌هایی جهت کاهش نفوذ دارو به داخل یاخته؛ ۳- افزایش بیرون راندن فعال ترکیبات دارویی از داخل دارو با پمپ کردن آن‌ها؛ ۴- غیر فعال کردن آنزیمی دارو به نحوه‌ی که توانایی عمل نداشته باشد (۲). عصاره‌های مشتق شده از گیاهان صدها سال است که در علم پزشکی جهت مبارزه با باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها کاربرد دارند (۳). اثرات عصاره‌های گیاهی روی میکروارگانیسم‌ها با تخریب دیواره‌ی سلولی یا غشای پلاسمایی، تخریب کامل سلولی، خروج محتویات سیتوپلاسمی و از کار انداختن سیستم تولید انرژی اعمال می‌شود (۴). شواهدی وجود دارد که باکتری‌ها به این عصاره‌های گیاهی مقاوم نمی‌شوند (۵)؛ همچنین ترکیبات گیاهی به‌صورت فراوان در دسترس هستند، برای سلول‌های پستانداران سمی نیستند و به راحتی در آب و خاک تجزیه می‌شوند و ضرری برای محیط طبیعی ندارند. این موارد از جمله مزایای جایگزینی ترکیبات گیاهی به جای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی جهت از بین بردن میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (۶). همان‌طور که ذکر شد یکی از موارد ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها، بیرون راندن ترکیبات دارویی با عملکرد فعال پمپ‌های افلوکس می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که ترکیب عصاره‌های گیاهی و آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند باعث افزایش تاثیر باکتری‌کشی آنتی‌بیوتیک‌ها شود. یکی از راه‌های این افزایش فعالیت، از طریق مهار فعالیت افلاکس پمپ‌ها توسط عصاره‌های گیاهی می‌باشد. سینرژیسمی بین آنتی‌بیوتیک‌ها و عصاره‌های گیاهی در مورد باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها از اهمیت بسیاری برخوردار است (۷). اهمیت این موضوع به این دلیل است که مهار کردن افلوکس پمپ‌ها توسط عصاره‌های گیاهی باعث بازگشت حساسیت سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود.

همچنین باعث کاهش دوز موثر آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود (۸). باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با توانایی ایجاد دامنه‌ی وسیعی از عفونت‌ها امروزه به یکی از معضلات مهم در زمینه‌ی پزشکی، دامپزشکی و بهداشت مواد غذایی تبدیل شده است. نکته‌ای که بر این مشکل می‌افزاید ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری و ظهور سویه‌های مقاوم به چند دارو می‌باشد. دارا بودن پمپ‌های افلوکس یکی از توانایی‌های این باکتری برای مقاوم شدن به آنتی‌بیوتیک‌هاست. از جمله مهم‌ترین این پمپ‌ها در این باکتری NorA، NorB، MdeA و Tet38 می‌باشند (۹ و ۱۰). در یک دهه‌ی اخیر بیشتر مطالعات روی مهار NorA تمرکز کرده‌اند به دلیل این که این پمپ در ایجاد سویه‌های MDR از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. ژن کدکننده‌ی NorA ابتدا در سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون‌ها شناسایی شد و این پمپ توانایی بیرون راندن آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین و ایجاد مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها را دارد (۱۱). مطالعات زیادی راجع به خاصیت ضد میکروبی گیاهان خانواده نعناییان انجام شده است. این مطالعات نشان داده‌اند که در این خانواده، آویشن به دلیل داشتن ترکیبات فنلی مانند Thymol، Carvacrol دارای خاصیت ضدمیکروبی زیادی هم علیه باکتری‌ها و هم قارچ‌هاست. همچنین گزارشاتی از اثرات ضدمیکروبی سینرژیسمی این گیاه در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌ها وجود دارد (۱۲). هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر اسانس گیاه آویشن دنایی (*Thymus daenensis*) روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و افلوکس پمپ NorA این باکتری، می‌باشد. جهت انجام این کار حساسیت باکتری مورد مطالعه به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین و همچنین رنگ اتیدیوم بروماید به‌عنوان ترکیبات پمپ شونده با NorA سنجیده می‌شود (۱۱).

روش بررسی

تهیه‌ی اسانس گیاه *آویشن دنایی*: گیاه *آویشن دنایی* با کد هرباریوم MPH 2000 از مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی تهیه و در سایه خشک گردید. عمل اسانس‌گیری به‌روش تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر (Clevenger) به‌مدت ۳ ساعت، انجام شد. اسانس حاصله در شیشه تیره جمع‌آوری و تا زمان استفاده داخل یخچال در دمای ۴+ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

باکتری‌های مورد مطالعه: در این مطالعه از *استافیلوکوکوس اورئوس* تحت گونه اورئوس ATCC25923 استفاده شد. باکتری مذکور از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران خریداری و تا زمان استفاده در فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شد. همچنین دو جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر گاو (گاوداری صنعتی اطراف شهر همدان) به‌عنوان منشا دامی باکتریایی، استفاده شد. این جدایه‌ها با روش‌های روتین جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از جمله کشت روی محیط‌های آگار خوندار، DNase Agar، مانیتول سالت آگار و تست‌های رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز و کواگولاز شناسایی شدند. جهت تایید این جدایه‌ها حضور ژن femA در آن‌ها با تکنیک PCR تایید گردید (۱۳)، (شکل ۱).

تعیین اثر اسانس *آویشن دنایی* روی میزان پمپ اتیدیوم بروماید با روش اتیدیوم بروماید-آگار کارت ویل: ابتدا سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) کشت داده شد. سپس با PBS استریل غلظت باکتریایی معادل استاندارد نیم‌مک‌فارلند گردید. برای انجام آزمایش محیط کشت BHI حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر اتیدیوم بروماید تهیه گردید. این کار روز آزمایش انجام گرفت و پلیت‌های محیط کشت تا زمان آزمایش در تاریکی نگه‌داری شد. از غلظت باکتری تهیه شده به روش چرخ درشکه‌ای (Cartwheel) کشت داده شد. و پلیت‌های محیط کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس پلیت‌های محیط کشت در دستگاه UV Transilluminator قرار داده شد و میزان فلورسنت ناشی از حضور اتیدیوم بروماید سنجیده شد. پلیت‌های محیط کشت دو گروه بودند. یک گروه آن‌هایی که فاقد اسانس آویشن بودند و گروه دوم حاوی غلظت MIC/4 در محیط کشت بودند. در نهایت میزان فلورسنت ایجاد شده بر روی خط کشت باکتری به‌عنوان میزان پمپ کردن اتیدیوم بروماید در نظر گرفته شد (۱۴).

تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی رشد برای اسانس گیاه آویشن دنایی، رنگ اتیدیوم بروماید و آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین کمترین غلظت مهارکنندگی رشد به روش میکرودایلوشن براث (Broth Microdilution) و مطابق با پروتوکل CLSI انجام گرفت (۱۵). به این صورت که در گوده اول (میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای) میزان ۱۷۰ میکرولیتر محیط کشت TSB ریخته شد سپس ۲۰ میکرولیتر از اسانس (ده برابر رقیق شده آویشن) به این گوده اضافه شد و نهایتا پس از انجام سری رقت از غلظت معادل نیم مک‌فارلند (۵×۱۰^{۵} cfu.ml^{-1}) کشت ۲۴ ساعته باکتری (هم باکتری کد دار و هم نمونه‌های بالینی به‌صورت جداگانه) میزان ۱۰ میکرولیتر به تمام گوده‌ها اضافه می‌شود. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد رقت آخرین گوده‌هایی که در آن رشد باکتری اتفاق نیفتاده بود به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای اتیدیوم بروماید و دو آنتی‌بیوتیک مورد آزمایش نیز به این صورت MIC تعیین گردید.

تعیین اثر اسانس *آویشن دنایی* روی میزان پمپ اتیدیوم بروماید، سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین با روش Checkerboard Test: در این روش ابتدا MIC آویشن، اتیدیوم بروماید، سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین

تعیین گردید. سپس اثر هم افزایی غلظت تحت MIC اسانس آویشن با دیگر فاکتورها بررسی شد. به این صورت که در یک میکروپلیت دیگر MIC/4 اسانس آویشن با هر کدام از مواد دیگر (اتیدیوم بروماید، سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین) به صورت ترکیبی استفاده و سپس Fraction Inhibitory Concentration Index (FICI) طبق فرمول زیر محاسبه شد (۱۶).

$$FICI=\frac{MIC(a+b)}{MICa}+\frac{MIC(a+b)}{MICb}$$

در فرمول فوق a و b دو متغییر هستند که اثر هم‌افزایی یا سینرژیسمی آن‌ها روی یک میکروارگانیسم بررسی می‌شود. به‌صورتی که اگر FICI ≤ ۰/۵ باشد به عنوان سینرژیسمی کامل، ۰/۵ < FICI ≤ ۰/۷۵نسبتا سینرژیسم، ۲ ≤ FICI < ۰/۷۵ بدون اثر و ۲ < FICI به صورت آنتاگونیست در نظر گرفته می‌شود (۱۶). به‌دلیل این که در یک سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاومت متفاوت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده و اتیدیوم بروماید به میزان فعالیت NorA وابسته است (۱۱) می‌توان کاهش معنی‌دار MIC این مواد را به عنوان مهار NorA در نظر گرفت.

آنالیز آماری: جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS 19 استفاده شد. معنی‌دار بودن کاهش MIC سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین و اتیدیوم بروماید در باکتری‌های مداخله شده با غلظت MIC/4 اسانس آویشن، با آزمون T-Test بررسی شد و سطح معنی‌دار کمتر از ۰/۰۱ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

آگار حاوی اتیدیوم بروماید در روش کارت ویل نشان داد که در محیط حاوی اسانس گیاه آویشن میزان جذب اتیدیوم بروماید توسط باکتری بیشتر از محیط بدون اسانس آویشن است. این موضوع با افزایش فلورسنت خط کشت باکتری در محیط قابل مشاهده است (شکل ۲). جدول ۱ میزان MIC اسانس *آویشن دنایی*، اتیدیوم بروماید و همچنین آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش را نشان می‌دهد. این میزان در حالت ترکیبی اسانس آویشن با ترکیبات دیگر مورد استفاده در این مطالعه کاهش معنی‌داری داشته است. به عنوان مثال MIC سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین از ۲ و ۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در نمونه بدون آویشن به ۰/۰۰۳۹ و ۰/۰۰۱۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر در نمونه حاوی غلظت تحت مهاری آویشن رسیده است (جدول ۲). در جدول ۳ نیز اثر هم‌افزایی اسانس آویشن با اتیدیوم بروماید و دو آنتی‌بیوتیک مورد استفاده با استفاده از روش Checkerboard Test تعیین شده است. مواردی که این اثر هم‌افزایی اتفاق افتاده است به صورت "*" مشخص شده است. نتایج نشان داد که اسانس گیاه آویشن در غلظت تحت مهاری (MIC/4) هم در مورد اتیدیوم بروماید و هم برای آنتی‌بیوتیک‌ها دارای اثر هم افزایی می‌باشد.

جدول ۱: MIC اسانس آویشن دنایی، اتیدیوم بروماید، سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین

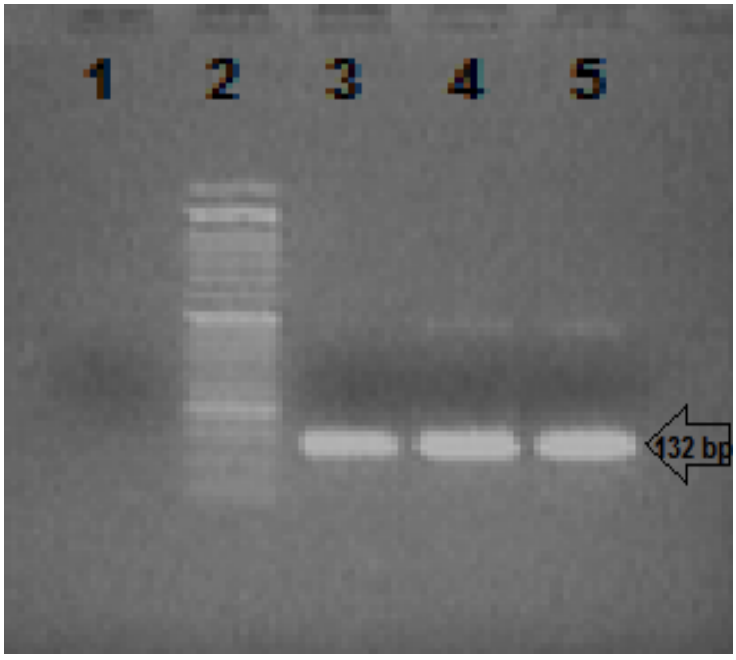
باکتری	MIC			
	نورفلوکساسین	سیپروفلوکساسین	اتیدیوم بروماید	آویشن دنایی
S.aureus ATCC 25923	۱/۲۵µg/ml	۲µg/ml	۲۵µg/ml	۲۰µl/ml
جدایه شماره یک *اورئوس*	۲µg/ml	۱µg/ml	۲۵µg/ml	۱۰µl/ml
جدایه شماره دو *اورئوس*	۲µg/ml	۱/۲۵µg/ml	۳/۱۲µg/ml	۱۰µl/ml

جدول ۲: MIC اتیدیوم بروماید، سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین در ترکیب با MIC/4 اساس آویشن دنایی

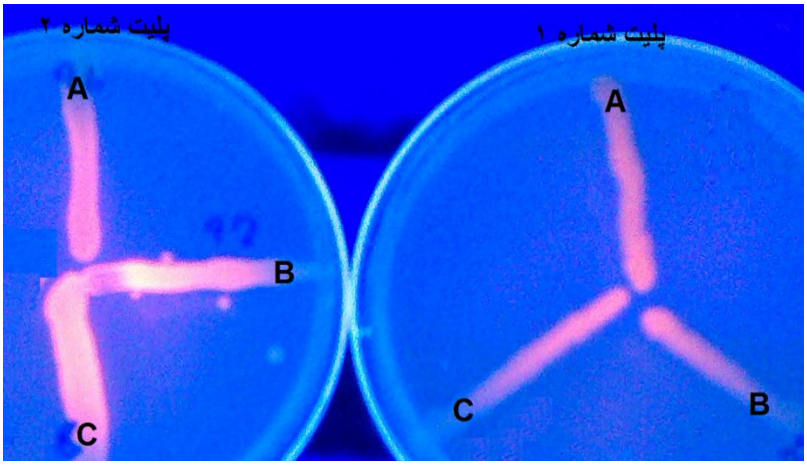
باکتری	MIC		
	نورفلوکساسین + MIC/4 آویشن	سیپروفلوکساسین + MIC/4 آویشن	اتیدیوم بروماید + MIC/4 آویشن
S.aureus ATCC 25923	۰/۰۰۱۹µg/ml	۰/۰۰۳۹µg/ml	۰/۳۱۲µg/ml
جدایه شماره یک *اورئوس*	۰/۰۰۷۸µg/ml	۰/۰۰۱۹µg/ml	۰/۰۷۸۱µg/ml
جدایه شماره دو *اورئوس*	۰/۰۰۷۸µg/ml	۰/۰۰۳۹ µg/ml	۰/۱۵۶µg/ml

جدول ۳: FICI اتیدیوم بروماید، سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین در ترکیب با MIC/4 اساس آویشن دنایی (*: اثرکاملاسینرژیسمی)

باکتری	FICI		
	نورفلوکساسین + MIC/4 آویشن	سیپروفلوکساسین + MIC/4 آویشن	اتیدیوم بروماید + MIC/4 آویشن
S.aureus ATCC 25923	*۰/۰۰۱۶	*۰/۰۰۲۹	*۰/۰۲۸
جدایه شماره یک *اورئوس*	*۰/۰۰۴۶	*۰/۰۰۲۰	*۰/۰۱۰
جدایه شماره دو *اورئوس*	*۰/۰۰۴۶	*۰/۰۰۳۵	*۰/۰۵۶



شکل ۱: PCR ژن femA. ۱: کنترل منفی ۲: مارکر 50bp ۳: کنترل مثبت (132bp) ۴ و ۵: جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس



شکل ۲: تعیین میزان پمپ اتیدیوم بروماید به روش کارت ویل. پلیت شماره یک فاقد اسانس آویشن و پلیت شماره ۲ حاوی اسانس آویشن. A: خط کشت مربوط به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 می‌باشد.B و C نیز به ترتیب مربوط به ایزوله‌های شماره یک و شماره دو می‌باشند.

بحث

باکتری‌ها از مکانیسم‌های زیادی جهت مقاومت در برابر ترکیبات شیمیایی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها بهره می‌برند. از جمله این راه کارها می‌توان به فعالیت افلوکس پمپ‌ها اشاره کرد. در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* NorA با مکانیسم Antiport وابسته به غلظت هیدروژن باعث بیرون راندن ترکیبات ضدمیکروبی از عرض غشای سلولی می‌شوند. مطالعات نشان داده است که بیرون راندن اتیدیوم بروماید از داخل یاخته وابسته به این پمپ است (۱۷). با مهار افلوکس پمپ‌ها یا کاهش بیان آن‌ها می‌توان فرآیند درمان با آنتی‌بیوتیک را بهبود بخشید. برای این منظور از ترکیبات مهار کننده افلوکس پمپ یا Efflux Pump Inhibitors (EPIs) استفاده می‌شود. این ترکیبات یا به صورت طبیعی وجود دارند و یا به صورت مصنوعی سنتز می‌شوند (۱۸). چندین ترکیب با خاصیت EPI در رابطه با پمپ NorA باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شده‌اند. از جمله این مواد آلکالوئیدهای گیاهی مانند رزرپین، کائمفرول، رامنوسید و کپسایسین می‌باشد (۱۹). این ترکیبات به صورت رقابتی به پمپ NorA در حین انتقال مواد متصل شده و فرآیند انتقال را مختل می‌کنند(۲۰). در مطالعه‌ی حاضر از اسانس گیاه *آویشن دنایی* جهت مهار پمپ NorA باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد. برای این منظور از دو روش کیفی و کمی استفاده شد. در روش کیفی میزان پمپ کردن اتیدیوم بروماید توسط باکتری سنجیده شد و در روش کمی میزان کاهش MIC آنتی‌بیوتیک‌های پمپ شونده توسط NorA در ترکیب با MIC/4 اسانس آویشن تعیین گردید. شکل ۱ نشان می‌دهد که در محیط کشت TSA حاوی ۱ میلی‌لیتر بر لیتر اسانس آویشن باعث کاهش بیرون رانش اتیدیوم بروماید شده است. این موضوع با افزایش نور فلورسنت خط کشت باکتری قابل مشاهده است. زمانی که باکتری قادر به پمپ اتیدیوم بروماید نباشد این ترکیب درون باکتری تجمع می‌یابد و با نور فلورسنت قوی در دستگاه ژل داک قابل مشاهده است (۱۴). این تکنیک نشان داد که هم در سویه استاندارد باکتری و هم در جدایه‌های کلینیکی اسانس *آویشن دنایی* باعث مهار افلوکس پمپ NorA شده است. در روش کمی میزان MIC اتیدیوم بروماید سویه استاندارد از

۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر به تنهایی به ۰/۳۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ترکیب با MIC/4 رسیده است. که حدودا ۶۵ برابر کاهش یافته است. این موضوع نشان می‌دهد که اسانس گیاه آویشن باعث افزایش ماندگاری اتیدیوم بروماید درون باکتری شده و یا به عبارت دیگر پمپ کردن این ماده دچار اختلال شده است. در دو جدایه‌ی *استافیلوکوکوس اورئوس* هم همین کاهش معنی‌دار MIC اتیدیوم بروماید در ترکیب با اسانس آویشن مشاهده می‌گردد (جدول ۱ و ۲). FICI مربوط به اتیدیوم بروماید در باکتری استاندارد و جدایه یک و دو به‌ترتیب ۰/۰۲۸، ۰/۰۱۰ و ۰/۰۵۶ می‌باشد که در هر سه باکتری سینرژیسمی کامل را بین اسانس آویشن و اتیدیوم بروماید نشان می‌دهد. مشابه با نتیجه تست کارت ویل، نتایج FICI نیز به‌صورت کمی کنترل پمپ NorA که مسوول انتقال اتیدیوم بروماید است را توسط اسانس آویشن نشان می‌دهد.

اسانس آویشن در سویه‌ی استاندارد باعث کاهش MIC سیپروفلوکساسین از ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ۰/۰۰۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر شده است (۵۱۳ برابر کاهش). در جدایه یک و دو نیز به ترتیب کاهش ۵۲۶ و ۳۲۰ برابری MIC در ترکیب با غلظت تحت مهاری اسانس آویشن مشاهده شد. برای آنتی‌بیوتیک نورفلوکساسین MIC سویه استاندارد در ترکیب با اسانس آویشن ۶۵۸ برابر و در مورد جدایه های یک و دو ۲۵۶ برابر کاهش داشت.این نتایج نشان می دهد که اسانس گیاه آویشن دنایی در غلظت تحت مهاری باعث کاهش چند صد برابری مقاومت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون از جمله سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین می‌شود (۱۱). کالیا و همکاران از ماده کپسایسین (Capsaicin) به‌عنوان مهارکننده افلوکس پمپ NorA در باکتری استفاده کردند. جهت بررسی خاصیت مهارکنندگی افلوکس پمپ از کاهش معنی‌داری MIC اتیدیوم بروماید و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین استفاده کردند آن‌ها نشان دادند که ترکیب مذکور باعث کاهش ۲ تا ۴ برابری MIC سیپروفلوکساسین علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* سویه SA-1199B می‌شود و کپسایسین را به‌عنوان یک مهارکننده NorA در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* معرفی کردند (۲۱). اسمیت و همکاران از ترکیب فنلی توتارول (Totarol) مشتق شده از درخت سرو جهت مهار پمپ NorA باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده کردند. آن‌ها جهت سنجش میزان مهار پمپ، از روش کاهش MIC اتیدیوم بروماید و آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون در ترکیب با MIC/4 توتارول استفاده کردند و در نهایت گزارش کردند که ماده مورد مطالعه هم خاصیت ضد باکتریایی و هم خاصیت مهار کنندگی پمپ NorA دارد (۲۲). در یک مطالعه‌ی مشابه مطالعه‌ی حاضر، خاصیت ضد باکتریایی ترکیب بایکالئین (Baicalein) مشتق شده از گیاه آویشن، علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بررسی شد. فوجیتا و همکاران در این مطالعه نشان دادند که MIC/4 ترکیب ذکر شده باعث کاهش MIC آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین از ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ۰/۰۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌شود. همچنین بیان کردند که این ترکیب باعث کاهش MIC آنتی‌بیوتیک‌های اگزاسیلین و آمپی‌سیلین علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین می‌شود. فوجیتا و همکاران همچنین اثر بایکالئین مشتق شده از آویشن را روی باکتری *اشریشیاکلی* بررسی کرده و بیان کردند که این ترکیب باعث مهار پمپ ***TetK*** می‌شود. پمپ ***TetK*** در باکتری *اشریشیاکلی* مسوول بیرون راندن تتراسایکلین می‌باشد(۲۳). مطالعات انجام شده در این زمینه نشان می‌دهند که از روش تعیین MIC اتیدیوم بروماید و آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین می‌توان جهت بررسی میزان فعالیت پمپ NorA باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده کرد. در مطالعه‌ی حاضر نیز کاهش معنی‌دار MIC این ترکیبات به وسیله اسانس گیاه

آویشن دنایی اتفاق افتاد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالا اسانس این گونه از آویشن به‌عنوان مهارکننده پمپ NorA باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* عمل می‌کند.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر (اثر سینرژیسمی با آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین) می‌تواند از اسانس گیاه *آویشن دنایی* در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌ها جهت درمان عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده کرد. لذا پیشنهاد می‌شود مطالعات وسیع‌تری جهت شناخت مکانیسم اثر این ترکیب گیاهی انجام شود؛ و همچنین اثر سینرژیسمی گیاه مذکور با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها بررسی گردد.

تقدیر و تشکر

این مقاله بخشی از پایان نامه دکتری تخصصی باکتری‌شناسی می‌باشد و نویسندگان از حمایت‌های مالی معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه بوعلی سینا همدان نهایت تقدیر و تشکر را دارند.

References

1- Teuretzbacher U. Resistance drives antibacterial drug development. *Curr Opin Pharmacol*. 2011; 11: 433-38.

2- Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. 2008; 45: 639-52.

3- Hammer K, Carson C, Riley T. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol*. 1999; 86: 985-90.

4- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int J Food Microbiol*. 2004; 94: 223-53.

5- ShaikMahaboob A, Khan AA, Ahmed I, et al. Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. A*nn Clin Microbiol Antimicrob*. 2005; 4: 1-7.

6- Isman MB. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot*. 2000; 19: 603-8.

7- Smith, ECJ, Kaatz GW, Seo SM, et al. The phenolic diterpenetotarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *AntimicrobAgents Chemother*.2007; 54: 4480-5448.

8- Pages JM, Amaral L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta: Proteins Proteomics*. 2009: 1794: 826-33.

9- Jarmula A, Oblak E, Wawrzycka D, et al. Efflux-mediated antimicrobial multidrug resistance. *PostepyHig MedDosw*.2010; 65: 216-27.

10- Markham PN, Neyfakh AA. Efflux-mediated drug resistance in gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2001; 4: 509-14.

11- Jadwiga H, Anna M, Katarzyna K. Recent advances in multi-drug resistance (MDR) efflux pump inhibitors of gram-positive bacteria *s. aureus*. *Antibiotics*. 2013; 2: 28-45.

12- Marzouk B, Edziri H, Haloui I, et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of a new chemotype of Tunisian *Thymus vulgaris* oils growing in Sayada. *J Food Agric Environ*. 2009; 7: 263-67.

13- Pelisser MR, Klein CS, Ascoli KR, Zotti TR, Arisi ACM.Ocurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex pcr detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Brazilian J Microb*. 2009; 40: 145-48.

14- Martins M, Viveiros M, Couto I, et al. Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the ethidium bromide-agar cartwheel method. *In Vivo*. 2011; 25: 171-8.

15- CLSI. Approved standard M7-A7.Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.7th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2006.

16- Didry N, Dubreuil L, Pinkas M. Microbiological properties of protoanemonin isolated from *Ranunculus bulbosus*. *Phytother Res*. 1993; 7: 21-24.

17- Neyfakh AA, Borsch CM, Kaatz GW. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux trans-porter. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993; 37: 128-9.

18- Wright GD, Sutherland AD. New strategies for combatingmultidrug- resistant bacteria. *Trend Mol Med*. 2007; 13: 260-67.

19- Holler JG, Slotved HC, Molgaard P. Chalcone inhibitors of the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus* whole cells and enriched everted membrane vesicles. *Bio Orgam Med Chem*. 2012; 20: 4514-21.

20- Holler JG, Christensen SB, Slotved HC, et al. Novel inhibitory activity of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump by a kaempferolrhamnoside isolated from *Persealingue*Nees. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67: 1138-44.

21- Kalia NP, Mahajan P, Mehra R, et al. Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcusaureus*. *J Anti Microb Chemother*. 2012; 67: 2401-8.

22- Smith EC, Kaatz GW, Seo SM, Warehamb N, Williamson EM, Gibbons S.

The phenolic diterpenetotarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus. J Anti Microb Age Chemother*. 2007; 51: 4480-83.

23- Fujita M, Shiota S, Kuroda T, et al. Remarkable synergies between baicalein and *Tetracycline, and baicalein and β-Lactams against methicillin-resistant staphylococcus aureus. Microb Immunol*. 2005; 49: 391-96.

Inhibitory Effect of *Thymus daenensis* Essential Oil on *Staphylococcus aureus* NorA Efflux Pump

Sharifi A[1], Mohammadzadeh A[1], Mahmoodi P[1], Sasanian N[2]

[1]Dept. of Pathobiology, Faculty of Paraveterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

[2]Dept. of Food Hygiene and Quality control, Faculty of Paraveterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

***Corresponding Author*:** Mohammadzadeh A, Dept. of Pathobiology, Faculty of Paraveterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

E-mail: Mohammadzadeh4@hotmail.com

Received: 1 Aug 2015 **Accepted:** 11 Jan 2016

***Background and Objective*:** Antibiotic resistant phenotypes of bacteria have been shown to be related to efflux pumps. Research for finding compounds with an ability to inhibit these pumps seems worthwhile due to their ability to increase bacterial sensitivity to antibiotics or return sensitivity to resistant strains. The aim of this study was to evaluate inhibitory effect of *Thymus daenensi*s essential oil (EO) on NorA efflux pump of *staphylococcus aureus*.

Materials and Methods: *Thymus daenensi*s essential oil was extracted from dried thyme leaves by hydrodistillation method and then the effect of the essential oil on bacterial efflux pump was evaluated using ethidium bromide-agar cartwheel method with respect to bacterial efflux capacity of ethidium bromide. Minimum inhibitory concentration (MIC) of *Thymus daenensi*s essential oil was measured using microdilution test followed by the evaluation of the effect of sub-MIC concentration of essential oil on fluoroquinolone antibiotics. The efflux level of ethidium bromide, ciprofloxacin and norfloxacin (substances transmitted by NorA) was considered as the NorA efflux pump activity.

Results: The cartwheel method showed that *Thymus daenensi*s essential oil could reduce the bacterial efflux capacity of ethidium bromide. The results of checkerboard test indicated that the interactions between sub-MIC concentration of the essential oil and ethidium bromide, ciprofloxacin and norfloxacin were totally synergistic.

Conclusion: Synergistic effect of *Thymus daenensis* essential oil with the other components demonstrated the potential of *Thymus daenensis* to enhance the antimicrobial activity of fluoroquinolone antibiotics against *staphylococcus aureus*. As these antibiotics are effluxed by NorA pump, this increased sensitivity to antibiotics is possibly due to NorA efflux pump inhibitors.

Keywords: NorA Efflux Pump, Staphylococcus aureus, Thymus Daenensis