



ISMJ 2014;17(5): 900-906

دوماهنامه طب جنوب

پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

سال هفدهم، شماره ۵، صفحه ۹۰۶-۹۰۰ (آذر و دی ۱۳۹۳)

اثر ضد میکروبی عصاره آویشن شیرازی بر استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

مریم متوسل^{۱*}، محمدعلی اخوت^۱، کامران زمردیان^۲، شهره فرشاد^۳

^۱مرکز تحقیقات علوم و فناوری تشخیص آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران

^۲بخش انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشکده علوم پزشکی شیراز، ایران

^۳مرکز تحقیقات میکروبی‌شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران.

(دریافت مقاله: ۹۱/۱۱/۱- پذیرش مقاله: ۹۲/۳/۵)

چکیده

زمینه: یکی از شایع‌ترین باکتری‌های عامل عفونت‌های بیمارستانی، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) است. امروزه کاربرد عصاره‌های گیاهی مانند آویشن شیرازی از خانواده لamiaceae در مقابله با باکتری‌ها در حال افزایش است. هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آویشن شیرازی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ۲۳۲ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جهت جداسازی سویه‌های MRSA جمع‌آوری شد با روش اگزاسیلین غربالگری انجام گرفت؛ در نهایت ۷۵ سویه به عنوان MRSA شناسایی شدند. سپس با روش ماسراسیون (Maceration)، از برگ‌های خشک گیاه، عصاره تهیه گردید. فعالیت ضد میکروبی عصاره با روش میکرو براث دایلوشن بررسی گردید و غلظت اولیه عصاره ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: حداقل غلظت عصاره که از رشد سویه‌های MRSA ممانعت به عمل می‌آورد (MIC) از ۲ تا ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر متفاوت بود. عصاره قادر بود که از رشد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین، در غلظت‌های ۱۶-۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر ممانعت به عمل آورد. همچنین عصاره توانست ۶۲/۶ درصد از باکتری‌های MRSA مورد آزمایش را در غلظت ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر یا بیشتر بکشد (MBC).

نتیجه‌گیری: عصاره آویشن شیرازی قادر به ممانعت از رشد باکتری‌های یادشده می‌باشد، همچنین اثر باکتری‌سیدال عصاره آویشن شیرازی کمتر از اثر مهاری آن بر باکتری‌های MRSA می‌باشد.

واژگان کلیدی: عصاره آویشن شیرازی، اثر ضد میکروبی، استافیلوکوکوس اورئوس، سویه‌های MRSA

* شیراز، مرکز تحقیقات علوم و فناوری تشخیص آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از شایع‌ترین باکتری‌های عامل عفونت بیمارستانی در بیماری‌های عفونی مثل اندوکاردیت، استئومیلیت و مسمومیت غذایی است (۱).

با حضور استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به بتالاکتام، از پنی‌سیلین آنتی‌بیوتیک جدیدی به نام متی‌سیلین تهیه گردید. خیلی زود سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از بیماران جداسازی شدند. سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس MRSA تهدیدی جدی در عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌آیند که روند درمان عفونت‌های این باکتری را با مشکل مواجه می‌سازند و مسبب بسیاری از مشکلات اپیدمیولوژی و بالینی در بیمارستان‌ها هستند. این ارگانیزم بین بیماران بستری در بیمارستان و کارکنان منتقل می‌شود. همچنین فاکتورهای ویرولانسی MRSA مشکلات جدی در افراد بیمار یا سالم مقیم بیمارستان فراهم می‌کند (۲).

فراوانی سویه‌های MRSA در کشورهای آسیایی مانند چین، کره و تایوان بیش از ۷۰ درصد، در آمریکای شمالی بیش از ۵۰ درصد، در اروپا ۲۰ درصد و در ایران حدود ۵۰ درصد است. MRSA در بیمارستان‌های نیویورک مسئول ۲۹ درصد عفونت‌های بیمارستانی و قریب ۵۰ درصد مرگ است (۳).

یکی از راه‌های مبارزه با این باکتری‌ها استفاده از داروهای گیاهی به جای آنتی‌بیوتیک‌ها است. از گیاهان مورد توجه می‌توان به آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria Multiflora* اشاره کرد. این گیاه در خانواده لامیاسیه قرار دارد. مؤثرترین ترکیب

ضدمیکروب آن تایمول (Thymol) و کاراکرول (Caracrol) است (۴).

این گیاه در ایران، پاکستان، هندوستان و افغانستان رشد می‌کند. برگ‌های خشک گیاه در صنایع غذایی به عنوان نگهدارنده و همچنین به دلیل طعم مطلوب آن مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵). عصاره آویشن شیرازی ایمنی ذاتی را محدود می‌کند (۶) و جلوی رشد بعضی از میکروارگانیزم‌ها مانند قارچ‌ها و باکتری‌ها را می‌گیرد (۴).

در این بررسی اثر عصاره الکلی آویشن شیرازی بر ۷۵ سویه MRSA بالینی جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان شهید فقیهی شیراز در سال ۱۳۹۰، مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی MRSA

نمونه‌های کشت داده شده شامل زخم، گوش، بینی، خون و کشاله ران بود. ۲۳۲ استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان شهید فقیهی شیراز در دوره زمانی سه ماهه در سال ۱۳۹۰ جداسازی شد. آزمایش‌های انجام شده جهت شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس شامل کوآگولاز لوله‌ای، DNase، رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز و مانیتول سالت آگار بودند (۲). برای جداسازی MRSA از آزمایش رشد بر محیط کشت مانیتول سالت آگار حاوی ۶ میکروگرم بر میلی لیتر آگازاسیلین همراه با نمک (۴ درصد جرمی/حجمی) استفاده شد (۷). پس از کشت و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، تعداد ۷۵ سویه از آنها به عنوان سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین MRSA شناسایی شدند.

تهیه عصاره

برای تهیه عصاره آویشن شیرازی از روش ماسراسیون (Maceration method) استفاده شد (۸). برای این کار، نخست مقداری برگ خشک شده آویشن شیرازی آسیاب شد. سپس با اتانول ۸۰ درصد مخلوط و در بطری تاریک نگهداری گردید. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در اتاق تاریک، فیلتر شد و در آخر توسط دستگاه تبخیر کننده چرخان (Rotary evaporate) (ساخت آلمان کارخانه HEIDOLPH مدل VB2000) تغلیظ شد. به این ترتیب عصاره بدون الکل به دست آمد. پس از آن عصاره مورد نظر در دمای 25°C - نگهداری شد. در پایان عصاره یخ زده توسط دستگاه سرما خشک کن (Freeze dryer) به پودر تبدیل شد (ساخت آلمان کارخانه ZEBRUS مدل VACO).

تعیین فعالیت ضد میکروبی آنتی بیوتیک‌های رایج بر علیه MRSA

ابتدا با روش دیسک دیفیوژن حساسیت باکتری‌ها بر علیه آنتی بیوتیک‌های رایج آزمایشگاهی سنجیده شد (۹). برخی از باکتری‌ها مقاوم و بعضی حساس به این آنتی بیوتیک‌ها بودند.

اندازه‌گیری حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) عصاره بر علیه MRSA

برای اندازه‌گیری MIC از روش میکرو برات دایلووشن برگرفته از پروتکل CLSI با کمی تغییرات استفاده شد (۹). جهت اندازه‌گیری فعالیت‌های ضد میکروبی عصاره آویشن بر علیه باکتری‌ها، غلظت اولیه ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره در حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) (ساخت آلمان کارخانه مرک) تهیه گردید. برای انجام آزمایش از پلیت میکروتیتر ۹۶ خانه (ساخت آمریکا کارخانه سیگما) و محیط کشت مولر هیتون برات

(ساخت آلمان کارخانه مرک) استفاده شد. سوسپانسیون باکتریایی با کمک استاندارد ۰/۵ McFarland در غلظت $10^5 \times 1/5$ CFU/ml تهیه گردید (۱۰). حجم ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری به تمام چاهک‌ها به جز کنترل منفی و اولین غلظت اضافه گردید. سپس میکروپلیت‌های کشت شده در دمای 35°C نگهداری شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفتند. چاهک کنترل مثبت شامل محیط کشت مایع، سوسپانسیون باکتری و حداکثر غلظت حلال بود در حالی که در چاهک کنترل منفی تنها محیط کشت و حلال موجود بود.

بعد از زمان انکوباسیون میکروپلیت‌های مورد آزمایش مطالعه شدند. تشکیل رسوب ته چاهک نشانه رشد باکتری و عدم تشکیل آن نشانه عدم رشد باکتری در نظر گرفته شد. غلظت اولین چاهک عدم رشد، مین حد اقل غلظت عدم رشد یا MIC بود.

اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره بر علیه MRSA

برای به دست آوردن MBC، ۱۰ میکرولیتر از غلظت MIC و غلظت‌های قبل از آن، بر روی مولر هیتون آگار (ساخت آلمان کارخانه مرک)، کشت نقطه‌ای داده شدند. تمامی پلیت‌های کشت شده در دمای 35°C به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند. پس از این مدت زمان پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند؛ غلظت اولین کشت نقطه‌ای که هیچ رشدی را نشان نداد، به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

چنانچه که جدول ۱ نشان می‌دهد غلظت‌های MIC و MBC عصاره الکلی آویشن شیرازی بر علیه MRSA و MSSA اندازه‌گیری شدند. عصاره الکلی آویشن

نوع مشکلات شیوع باکتری‌های مقاوم به چند دارو می‌باشد. MRSA یکی از این نوع باکتری‌ها است. بسیاری از پژوهشگران برای حل این مشکل، متوجه اثر عصاره گیاهان بر باکتری‌های یادشده به جای آنتی‌بیوتیک‌ها شدند (۴، ۵ و ۱۱).

بر اساس مطالعات قبلی مشخص شده است که عصاره آویشن شیرازی می‌تواند از رشد انتروهومورازیک E. Coli (۱۲-۱۴)، گونه‌های سالمونلا و شیگلا (۱۳)، ۱۵ و ۱۶)، استافیلوکوکوس اورئوس (۱۷ و ۱۸)، کلبسیلا (۱۵)، انتروکوکوس (۱۹) جلوگیری به عمل آورد.

همچنین سودوموناس ائروژنوزا (۲۰)، اسپیتوباکتر باومنی، آلکالیژنز و کریژنوباکتریوم منگوسپتیکوم در گروه باکتری‌های گرم منفی غیر تخمیری (NFB) (۱۸) نیز توسط این عصاره ممانعت از رشد می‌شوند.

در بررسی کنونی، اثر عصاره الکلی آویشن شیرازی بر استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی مشخص گردید که روش میکرو برات دایلوژن بسیار حساس‌تر از ماکرو برات دایلوژن و دیسک آگار دیفیوژن است. این در حالی است که بررسی‌های سایر محققان نیز این نتیجه را تأیید می‌کند (۱۱).

مطالعه کنونی نشان می‌دهد که عصاره الکلی آویشن می‌تواند مانع رشد سویه‌های MRSA شود و ۶۲/۶ درصد آن‌ها را بکشد.

عصاره مورد آزمایش همچنین می‌تواند مانند MRSA مانع از رشد MSSA، استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس شود. در این مطالعه هیچ اختلافی بین باکتری‌های یادشده از لحاظ ممانعت از رشد و کشندگی آن‌ها وجود ندارد.

شیرازی از رشد سویه‌های MRSA در غلظت‌های ۱۶-۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر جلوگیری به عمل آورد. همچنین این عصاره در غلظت‌های ۸ تا ۱۶ مانع رشد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و سویه استاندارد ATCC 25923 از استافیلوکوکوس اورئوس شد. غلظتی از عصاره که باعث کشتن باکتری‌های مورد آزمایش می‌شود، ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر یا بیشتر بود. مشخص شد که تعداد ۴۷ باکتری (۶۲/۶ درصد) از کل سویه‌های MRSA جدا شده (۷۵ سویه) توسط عصاره آویشن کشته شدند.

جدول (۱) مقایسه MIC و MBC عصاره آویشن شیرازی بر استافیلوکوکوس‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)

باکتری	MIC		MBC		تعداد
	غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	تعداد باکتری	غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	تعداد باکتری	
استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین	۲	۵	۲	۰	۷۵
	۴	۱۲	۴	۰	
	۸	۳۰	۸	۰	
	۱۶	۲۸	۱۶	۳	
	۳۲	۰	۳۲	۱۳	
	۶۴	۰	۶۴	۶	
استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923	۱۲۸	۰	۱۲۸	۷	۱
	۲۵۶	۰	۲۵۶	۱۰	
	۵۱۲	۰	۵۱۲	۷	
استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین	۱۶	۱	۱۶	۱	۱
	۲۵۶	۱	۲۵۶	۱	
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	۱۶	۱	۱۶	۱	۱
	۲۵۶	۱	۲۵۶	۱	
استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس	۸	۱	۵۱۲	۱	۱

بحث

امروزه باکتری‌های مقاوم به دارو می‌توانند مهم‌ترین بیماری‌های عفونی را ایجاد کنند. یکی از جنبه‌های این

عصاره جهت جلوگیری از رشد باکتری مورد استفاده قرار گیرد. همچنین پیشنهاد می‌شود آزمایش‌هایی در خصوص مصرف عصاره به صورت لوسیون و ضماد، بر روی پوست جهت جلوگیری از رشد استافیلوکوکوس صورت گیرد.

این تحقیق نشان می‌دهد که غلظت کم عصاره آویشن در حد کفایت مانع از رشد MRSA می‌شود. همچنین مشخص شد که اثر ممانعتی عصاره از رشد باکتری‌های مورد نظر بهتر از اثر کشندگی آن است. به دلیل آنکه در رژیم غذایی ایرانیان آویشن شیرازی کاربرد فراوان دارد، پیشنهاد می‌شود که غلظت زیاد

References:

- Classics in infectious diseases. "On abscesses". Alexander Ogston (1844-1929). Reviews of infectious diseases 1984;6:122-8.
- Koneman EW. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
- Rubin RJ, Harrington CA, Poon A, et al. The economic impact of Staphylococcus aureus infection in New York City hospitals. Emerg Infect 1999;5:9-17.
- Shafiee A, Javidnia K. Composition of essential oil of Zataria multiflora. Planta medica 1997;63:371-2.
- Gandomi H, Misaghi A, Basti AA, et al. Effect of Zataria multiflora Boiss. essential oil on growth and aflatoxin formation by Aspergillus flavus in culture media and cheese. Food Chem Toxicol 2009;47:2397-400.
- Dakhili M., Zahraei Salehi M.T., Torabi Goudarzi M., Khavari A. Evaluation of Antimicrobial Effects of 4 Medicinal Plants Against Salmonella Typhimurium and Comparison Them With Common Antibiotics in Veterinary Medicine. J Med Plants 2006;5:21-6.
- Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Infections. Laboratory Detection of Oxacillin/Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. (Accessed August 25 ,2013 .at <http://www.cdc.gov/mrsa/index.html>).
- Remington JP, Gennaro AR. Remington's pharmaceutical sciences. 18th ed. Easton, Pa.: Mack Pub. Co.; 1990.
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard. Wayne, PA: The Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
- Baron EJ, Finegold SM, Scott EG, et al. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. Saint Louis: Mosby 1990.
- Arab R., Ettehad G.H. Effects of Zataria Multiflora Boiss on Common Pathogenic Gram-Positive Cocci and Gram-Negative Bacilli. J AnimVet Advances 2008;7:695-7.
- Fazlara A, Najafzadeh H, Lak E. The potential application of plant essential oils as natural preservatives against Escherichia coli O157:H7. Pak J Biol Sci. 2008;11: 2054-61.
- Fazeli MR., Gholamreza A., Ahmadian Attri MM. Antimicrobial activity of sumac and Avishen-e-shirazi (Zatiria multiflora) against some food-born bacteria. Food Control 2007;8:646-9.
- Mayrhofer S, Paulsen P, Smulders FJ, et al. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. Int J Food Microbial 2004;97:23-9.
- Abbasgholizadeh N, Ettehad G, Arab R, et al. Antibacterial effects of Zataria multiflora Boiss (Shiraz organo essence) on Enterobacteriaceae species. Res J Biol Sci 2008;3:345-47.
- Shokri H, Asadi F, Bahonar AR, Khosravi AR. The role of Zataria multiflora essence (Iranian herb) on innate immunity of animal model. Iran J Immunol 2006;3:164.
- Zahraei MT., Vojgani M., Bayat M., et al. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of extract of Zataria multiflora against the clinical isolates of Streptococcus agalactiae, Staphylococcus aureus and E.coli. J Vet Res 2005;60:107-10.

18. Motevasel M, Zomorodian K, Mansouri A, et al. The anti-bacterial effects of *Zataria multiflora* extract on common pathogenic Gram positive cocci, pathogenic Gram negative bacilli and non-pathogenic bacteria. *Afr J Microbiol Res* 2011;5:4993-6.
19. Mir N, Sánchez M, Baquero F, et al. Soft salt-mannitol agar–cloxacillin test: a highly specific bedside screening test for detection of colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1998;36:986-9.
20. Owlia P, Saderi H, Rasooli I, et al. Antimicrobial characteristics of some herbal Oils on *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to their chemical compositions. *Iranian J Pharmaceut Res* 2010;8:107-14.

Original Article

Antibacterial Effect of *Zataria multiflora* Extract on MRSA

M. Motevasel^{1*}, MA. Okhovat¹, K. Zomorodian², Sh. Farshad³

¹ Diagnostic Laboratory Sciences and Technology Research Center, School of Paramedical Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, IRAN.

² Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, IRAN.

³ Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, IRAN.

(Received 20 Jan, 2013 Accepted 26 May, 2013)

Abstract

Background: One of the common nosocomial bacteria is methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Today, herbal extracts like *Zataria multiflora* from *Lamiaceae* family are increasingly used. The aim of this study is the evaluation of the antibacterial effect of *Zataria Multiflora* extract on MRSA.

Material and Methods: 232 strains of *Staphylococcus aureus* were examined for isolation of MRSA strains. As a result, 75 out of 232 strains were identified as MRSA by oxacillin screening method. Consequently, the antibacterial effect of *Zataria multiflora* on 75 strains of MRSA was evaluated. The extract of *Z. multiflora* was prepared from dried leaves, using maceration method. The antibacterial activity of the extract with an initial concentration of 200 µg/ml was determined by micro broth dilution method.

Results: It is shown that the minimum inhibitory concentration (MIC) is varied from 2-16 µg/ml for MRSA strains. It inhibited the growth of *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* and methicillin sensitive *S. aureus* (MSSA), with approximately 8-16 µg/ml. The minimum bactericidal concentration (MBC) of the extract that could destroy 62.6% MRSA strains and the other examined bacteria was 512 µg/ml and more.

Conclusion: It seems that *Zataria multiflora* extract could inhibit the growth of all of the mentioned bacteria. The bactericidal effect of *Zataria multiflora* extract was less than its bacteriostatic effect.

Key words: *Zataria multiflora* extract, antibacterial effect, *Staphylococcus aureus*, MRSA

*Address for correspondence: School of Paramedical Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, IRAN.
E-mail: maryam.motevasel@gmail.com