



دوره ۷۸، شماره ۱، ۱۴۰۲، ۶۷-۷۶

ارزیابی تأثیر ضدباکتریایی کارواکرول به تنهایی و در ترکیب با آنتی بیوتیک سفکسیم در برابر

باکتری اشریشیا کلی H_7 : O_{157} سپیده اسدی^۱، بهار نیری فسایی^۲، تقی زهرایی صالحی^۲، رامک یحیی رعیت^۲، نعمت شمس^۳^۱ دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران^۲ گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران^۳ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۲۴ بهمن ۱۴۰۱، تاریخ پذیرش: ۳۰ فروردین ماه ۱۴۰۲

doi 10.22059/jvr.2022.333699.3207



20.1001.1.20082525.1402.78.1.7.9

چکیده

زمینه مطالعه: امروزه استفاده از ترکیبات گیاهی و مشتقات آن مانند عصاره‌ها و اسانس‌ها جهت مبارزه با عوامل عفونی بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است. یکی از ترکیبات فعال ضد میکروبی با منشأ گیاهی کارواکرول می‌باشد.

هدف: ارزیابی اثر ضدباکتریایی کارواکرول به تنهایی و در ترکیب با آنتی بیوتیک سفکسیم در برابر اشریشیا کلی H_7 : O_{157} .

روش کار: خواص ضدباکتریایی کارواکرول و سفکسیم با تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) Minimum Inhibition Concentration، حداقل غلظت کشندگی (MBC) Minimum Bactericidal Concentration و روش انتشار در آگار مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور برهمکنش کارواکرول و سفکسیم و تعیین غلظت بازدارنده افتراقی (FIC شاخص) از روش چکربرد استفاده شد.

نتایج: حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی کارواکرول و سفکسیم علیه باکتری اشریشیا کلی H_7 : O_{157} به ترتیب برابر (MIC, MBC) ۲۵۰، ۲۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و (MBC, MIC) ۱۲۸، ۱۲۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. در روش چکربرد، در حالت ترکیب کارواکرول با آنتی بیوتیک سفکسیم در برابر H : O_{157} *E. coli* اثر سینرژیستی مشاهده شد (FIC=۰/۵ شاخص).

نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه کارواکرول، مطالعه حاضر این عامل را به عنوان یک داروی ضدباکتریایی با منشأ طبیعی معرفی می‌کند. همچنین از آن جایی که کارواکرول خواص ضدباکتریایی سفکسیم را به طور معنی‌داری افزایش داد (خواص سینرژیستی)، می‌توان کارواکرول را به عنوان یک ترکیب مؤثر جهت افزایش قدرت ضد باکتریایی آنتی بیوتیک سفکسیم معرفی نمود.

کلمات کلیدی: اشریشیا کلی H_7 : O_{157} ، سفکسیم، چکربرد، ضد میکروبی، کارواکرول

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: بهار نیری فسایی، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های دفاعی در برابر بیماری‌های عفونی، استفاده از آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد. با این حال، سوء استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در زمینه‌های مختلف پزشکی، دامپزشکی و صنعت منجر به ظهور سویه‌های مقاوم به دارو شده است. این امر نگرانی بهداشت عمومی را در سراسر جهان افزایش داده است (۱).

امروزه، گسترش روزافزون مقاومت‌های دارویی در میان باکتری‌ها در کنار سمیت و عوارض جانبی داروهای موجود سبب شده است تا توجه بیشتری به سمت داروهای مناسب‌تر با اثرات سمی و عوارض جانبی کمتر معطوف گردد و برای این منظور گیاهان دارویی نیز مورد توجه

خاصی قرار گرفته‌اند. از زمان‌های قدیم، گیاهان دارویی و ترکیبات آن‌ها مانند کارواکرول در طب سنتی برای اهداف مختلف در سراسر جهان استفاده شده است (۲، ۳).

کارواکرول یا سایموفنول (۵-ایزوپروپیل-۲-متیل فنول) یک ترکیب فنلی مونوترپنوئید است که از اسانس‌های خانواده لامیاسه (Lamiaceae) از جمله آویشن، پونه کوهی و مرزه به‌دست آمده است (۴).

کارواکرول دارای خواص بیولوژیکی مختلف از جمله خواص نظیر آنتی‌اکسیدانی (۵)، ضدالتهاب (۶)، ضدسرطان (۷)، ضدتب (۸) و ضد درد می‌باشد (۹).

سویه *اشریشیا کلی* O₁₅₇:H₇ مهم‌ترین سویه پاتوتایپ انتروهموراژیک *اشریشیا کلی* (Enterohemorrhagic *E. coli*) و پاتوژن با منشأ غذایی مشترک بین انسان و دام در سراسر جهان شناخته شده است (۱۰، ۱۱). عفونت این سویه در انسان می‌تواند به‌صورت کولیت هموراژیک (HC)، سندروم همولیتیک اورمیک (HUS) و پورپورای ترومبوتیک ترمبوسیتوپنیک (TPP) به‌صورت کشنده نیز بروز نماید (۱۲). در بیماران مبتلا به همولیتیک اورمیک مصرف آنتی‌بیوتیک به‌طور کلی محدود است زیرا سلول‌های باکتریایی توسط آنتی‌بیوتیک لیز می‌شوند و مقدار زیادی توکسین مشابه شیگا (Shiga-like Toxin) را آزاد می‌کنند (۱۳).

بیماری‌های یاد شده می‌تواند با بروز ناگهانی، تمام گروه‌های سنی را درگیر کند. اما بیشتر قشرهای آسیب‌پذیر جامعه (کودکان یا سالمندان) در معرض بیشترین خطر ابتلا به عفونت حاد قرار دارند که آن را به یک موضوع مهم در سلامت جامعه و نیز در صنایع غذایی و کشاورزی تبدیل کرده است (۱۴). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر جهت درمان و کنترل بیماری‌های ناشی از این سویه در انسان و حیوانات بهترین اقدام محسوب می‌گردد، اما با این حال مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر *اشریشیا کلی* O₁₅₇:H₇ گزارش گردیده است (۱۵).

امروزه، با تمایل بشر به محصولات ارگانیک اهمیت شناخت علمی این مواد دوچندان شده است، فعالیت‌های ضدباکتریایی هم‌افزایی ترکیبات مختلف گیاهی در حضور آنتی‌بیوتیک‌ها توسط محققین گزارش شده است (۱۶، ۱۷).

مطالعات گذشته بیانگر اثر ضدباکتریایی و ضدیوفیلی کارواکرول می‌باشد (۱۸، ۱۹). همچنین گزارش شده است که کارواکرول حداقل سمیت را روی سلول‌های انسانی اعمال می‌کند (۲۰).

در گذشته بررسی‌هایی در مورد اثر ضد میکروبی کارواکرول روی برخی باکتری‌های پاتوژن گزارش شده است (۲۱، ۲۲). با توجه به مطالب ذکر شده و به‌دلیل اهمیت بالای مسئله مقاومت آنتی‌بیوتیکی و مقابله با آن و خواص مثبت گزارش شده از ترکیبات مشتق شده از گیاهان، هدف از انجام مطالعه حاضر اثر هم‌افزایی کارواکرول و سفکسیم علیه باکتری *اشریشیا کلی* O₁₅₇:H₇ بود.

مواد و روش کار

سویه باکتریایی: باکتری مورد استفاده در مطالعه حاضر *اشریشیا کلی* انتروهموراژیک (ATCC ۳۵۲۱۸) بود.

تعیین خاصیت ضدباکتریایی کارواکرول و آنتی‌بیوتیک سفکسیم (انتشار در آگار به کمک دیسک): جهت تعیین حساسیت *اشریشیا کلی* O₁₅₇:H₇ از (روش کربی بائر و طبق دستورالعمل آزمایشگاهی و کلینیکی CLSI) استفاده شد. سویه مذکور پس از تعیین هویت نهایی توسط آزمایش‌های بیوشیمیایی به روش انتشار در آگار توسط دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (پادتن طب، ایران) تعیین حساسیت دارویی گردید. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک تجاری سفکسیم (۵ میکروگرم) بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) که قبلاً آماده شده، قرار داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری انجام گرفت. پس از ۲۴ ساعت هاله عدم رشد مشاهده گردید، قطر آن اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر اعلام شد (CLSI ۲۰۱۹).

برای ارزیابی خاصیت ضد میکروبی مواد مؤثره کارواکرول (Sigma – Aldrich) از روش انتشار در آگار با استفاده از اندازه‌گیری هاله عدم رشد، استفاده شد. ابتدا سویه *اشریشیا کلی* O₁₅₇:H₇ در سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند تهیه و سپس دیسک‌های بلانک استریل به ۲۰ میکرولیتر مواد مؤثره کارواکرول که حاوی محلول ۱ درصد دی‌متیل سولفو کساید (DMSO) به‌عنوان حلال بود با رقت (۱۰۰۰)،

۵۰۰، ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) آغشته گردید و پس از جذب آن توسط دیسک‌ها، با پنس استریل بر روی محیط‌های کشت شده که از قبل آماده شده بود، قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد ایجاد شده، که ناشی از ممانعت رشد باکتری توسط ماده آنتی‌باکتریال بود، اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر اعلام گردید، تمام آزمون‌ها جهت تأیید آزمایش، به صورت سه بار تکرار انجام شد (۲۳).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC): در مطالعه حاضر حداقل غلظت مهارکنندگی علیه اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ با استفاده از روش میکرودايلوشن براث با ۳ بار تکرار انجام شد. در این روش به هر کدام از چاهک‌های ردیف یک تا هشت پلیت ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت TSB (Trypticas soya Broth) (مرک، آلمان) اضافه گردید. سپس به اولین چاهک هر ردیف ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی از کارواکرول (۳/۹۰-۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و آنتی‌بیوتیک سفکسیم (۴-۱۰۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر) تهیه شد و به محیط کشت TSB براث اضافه شد و سریال رقت تا آخرین چاهک تهیه شد. در چاهک شماره ۱۲ (کنترل مثبت) فقط محیط کشت باکتری اضافه گردید. در این مرحله ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده باکتری با غلظت نهایی معادل نیم مک فارلند به صورت جداگانه به تمام چاهک‌ها به جز چاهک شماره ۱۱ (کنترل منفی) هر ردیف اضافه گردید. در مرحله بعد پلیت‌ها روی شیکر اوربیتال قرار گرفت تا مخلوط یکنواخت گردد. در آخر میکروپلیت در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و بعد از اتمام انکوباسیون کدورت یا عدم کدورت چاهک‌ها توسط جذب نوری توسط الایزا ریدر (USA, Fax ۲۱۰۰Star) در ساعت صفر و با طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت گردید. کمترین غلظتی که کدورتی مشاهده نشود بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر به عنوان (MIC) در نظر گرفته شد. به منظور اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از چاهک‌های فاقد کدورت (غلظت‌های MIC و بالاتر) که رشدی در آن صورت نگرفته بود، مقدار ۱۰ میکرولیتر در شرایط کاملاً استریل و زیر هود میکروبی برداشته و بر روی محیط ژلوز خوندار (مرک، آلمان) کشت داده شد، پس از گذشت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با مشاهده اولین غلظتی که در آن باکتری رشد نکرده بود حداقل غلظت کشندگی (MBC) آنتی‌باکتریال، نیز تعیین گردید (۲۴).

ارزیابی اثر هم‌افزایی کارواکرول و آنتی‌بیوتیک سفکسیم و تعیین شاخص غلظت مهارکنندگی سهمی (FICI): به منظور ارزیابی توأم اثر ضد میکروبی کارواکرول در ترکیب با آنتی‌بیوتیک سفکسیم بر اساس غلظت مهارکنندگی سهمی و از روش مرسوم به تیتراسیون چکریورد استفاده شد. در واقع غلظت مهارتی مشترک کسری از غلظت ماده مهارکننده در حال ترکیب، نسبت به وقتی که همان ماده به تنهایی استفاده می‌شود. در این روش به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از ترکیبات ضد میکروبی افزوده شد. در هر ردیف افقی، آنتی‌بیوتیک سفکسیم از غلظت‌های ۲۵۶ تا غلظت ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و ردیف عمودی در هر ستون از بالا به پایین از غلظت‌های ۵۰۰ تا غلظت ۷/۸۱ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس کارواکرول اضافه شد. در نهایت در میکروپلیت مورد بررسی هر کدام از غلظت‌های کارواکرول در ترکیب با تمام غلظت‌های آنتی‌بیوتیک بود. در ادامه به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی با غلظت نهایی معادل نیم مک فارلند افزوده شد. هر پلیت حاوی کنترل مثبت و منفی بود. چاهک کنترل مثبت حاوی سوسپانسیون باکتری و محیط کشت و چاهک کنترل منفی حاوی محیط کشت بدون باکتری بود. پس از آن که محتویات هر چاهک به خوبی مخلوط شد، مطابق بخش قبل میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار قرار داده و گرم‌خانه‌گذاری شد. برای تعیین میزان غلظت مهارتی کسری (FIC) برای ترکیب مواد بر اساس معادلات (۱-۳) استفاده شد.

$$FIC_{AB} = MIC_{AB} CoM / MIC_{AB} A \quad \text{معادله ۱}$$

$$FIC_{Eos} = MIC_{Eos} CoM / MIC A \quad \text{معادله ۲}$$

$$FIC_{index} = FIC_{AB} + FIC_{Eos} \quad \text{معادله ۳}$$

FIC_{AB} - غلظت مهارتی کسری سفکسیم

$MIC_{AB} CoM$ - حداقل غلظت مهارکنندگی ترکیبی سفکسیم

$MIC_{AB} A$ - حداقل غلظت مهارکنندگی سفکسیم به تنهایی

FIC_{Eos} - غلظت مهاری کسری کارواکرول

MIC_{Eos} COM - حداقل غلظت مهارکنندگی ترکیبی کارواکرول

MIC_{Eos} A - حداقل غلظت مهارکنندگی کارواکرول به تنهایی

از مجموع FIC هر عامل ضد میکروبی، شاخص غلظت مهارکننده سهمی (FICI) به دست آمد. پس از محاسبه FICI تفسیر نتایج با استفاده از دستورالعمل کمیته اروپایی آزمون سنجش حساسیت ضد میکروبی (EUCAST) صورت پذیرفت. بر این اساس چنانچه FICI کوچکتر یا مساوی ۰/۵ باشد، برهمکنش از نوع هم افزایی، بزرگتر از ۰/۵ تا ۱ از نوع افزایشی بزرگتر از ۱ تا کوچکتر از ۲ از نوع عدم تأثیر و مساوی یا بزرگتر از ۲ از نوع رقابتی می باشد (۲۶، ۲۵).

نتایج

انتشار در آگار به کمک دیسک: یافته‌های حاصل از تست آنتی بیوگرام سویه استاندارد/شریشیا کلی $O_{157} : H_7$ نسبت به آنتی بیوتیک سفکسیم با میانگین هاله مهار رشد ۲۳ میلی متر نشان دهنده حساسیت سویه مذکور بود.

همچنین بررسی خاصیت ضدباکتریایی کارواکرول نشان داد که سویه مذکور حساس بوده و هیچ گونه مقاومتی مشاهده نگردید. میانگین هاله عدم رشد در مجاورت رقت‌های کارواکرول (۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) به ترتیب برابر ۳۸، ۳۰ و ۱۸ میلی متر بود.

تعیین MIC و MBC: میزان حداقل مهارکنندگی از رشد (MIC) به دست آمده برای کارواکرول و سفکسیم به ترتیب برای /شریشیا کلی $O_{157} : H_7$ ، ۲۵۰ و ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر و حداقل اثر کشندگی (MBC) ۲۵۰ و ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر گزارش شد.

اثر هم افزایی کارواکرول و آنتی بیوتیک سفکسیم و تعیین شاخص غلظت مهارکنندگی سهمی (FICI): نتایج برهمکنش کارواکرول و آنتی بیوتیک سفکسیم به روش چکربرد علیه ایزوله /شریشیا کلی $O_{157} : H_7$ نشان دهنده اثر هم افزایی این دو عامل ضدباکتریایی بود. کارواکرول و آنتی بیوتیک سفکسیم در نقطه سینرژیستی به ترتیب دارای MIC با غلظت‌های ۶۲/۵ و ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر بودند و میزان FIC در ترکیب مذکور به ترتیب برای آنتی بیوتیک و کارواکرول ۰/۲۵ و ۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر به دست آمد و مقدار FICI برابر با ۰/۵ محاسبه شد.

بحث

امروزه به خوبی نقش و اهمیت استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات آن‌ها جهت درمان بیماری‌های مختلف توسط بشر درک شده است. استفاده از منابع نامحدود و متنوع گیاهی توسط انسان در طول قرن‌های متمادی سابقه‌ای بس طولانی داشته و با توجه به شناخت و تجربه‌ای که در این سالیان بشر از کاربرد گیاهان کسب کرده است به تدریج روش‌های نوینی را برای استفاده از گیاهان و ترکیبات آن‌ها توسعه داده است. در حال حاضر علاقمندی جهت استفاده از درمان طبیعی به وسیله گیاهان دارویی با کمترین اثر جانبی در حال افزایش است (۲۷).

از سوی دیگر به دلیل افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها و بار اقتصادی مقاومت باکتریایی، به علاوه کاهش فعالیت آنتی بیوتیک‌ها تحت تأثیر pH، غیرفعال سازی آنزیمی و حلالیت و ثبات ضعیف داروها، عوارض جانبی نامطلوب و عوامل دیگر همچون عدم توسعه و تولید داروهای ضد میکروبی جدید نیاز حیاتی به طراحی جدید آنتی بیوتیک‌ها با مکانیسم‌های چندگانه وجود دارد (۲۸).

در گذشته، گیاهان دارویی و ترکیبات آن‌ها مانند کارواکرول در طب سنتی برای اهداف مختلفی در سراسر جهان مورد استفاده قرار گرفته است. علاوه بر این به دلیل خواص بیولوژیکی متفاوت به ویژه خواص ضد میکروبی آن‌ها، می توان از آن‌ها برای بهبود کیفیت غذا و افزایش ماندگاری آن‌ها استفاده کرد (۲۹، ۳۰).

کارواکرول یک مشتق فنولی مونوترپنوئید است که در برخی گیاهان از جمله پونه کوهی و آویشن یافت می شود. با توجه به خواص بیولوژیکی مختلف کارواکرول، مطالعات زیادی بر روی این ترکیب برای ارزیابی قابلیت استفاده آن در پزشکی انجام شده است (۳۱).

در مطالعه حاضر، اثرات ضدباکتریایی کارواکرول و سفکسیم را به صورت جداگانه و در ترکیب با هم در برابر عامل بیماریزا با منشأ غذایی و ژئونوتیک / اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ از طریق دیسک دیفیوژن، تعیین میزان MIC، MBC و FIC، بررسی شد.

میزان حداقل مهارکنندگی از رشد (MIC) به دست آمده برای کارواکرول و سفکسیم به ترتیب برای اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ ، ۲۵۰ و ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر و حداقل اثر کشندگی (MBC) ۲۵۰ و ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر بود. همان طور که در مورد روش کیفی دیسک دیفیوژن نیز بیان شد، تأثیرگذاری کارواکرول علیه اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ بیشتر از سفکسیم دیده شد. میزان حداقل غلظت مهارتی کسری (FIC) نیز برای تأیید اثر هم افزایی کارواکرول و سفکسیم علیه اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ به ترتیب $0/25 + 0/25$ میکروگرم در میلی لیتر و FICI برابر با $0/5$ دیده شد، کارواکرول و آنتی بیوتیک سفکسیم در نقطه سینرژیستی به ترتیب دارای MIC با غلظت های $62/5$ و 32 میکروگرم در میلی لیتر بودند. در این آزمون نیز اثر گذاری مواد آنتی باکتریال بر روی سویه مذکور به وضوح مشخص شد.

مقدار MIC و MBC کارواکرول در مطالعه حاضر در برابر اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر بود. این نتیجه کاملاً با آنچه در مطالعه Magi و همکاران در سال ۲۰۱۵ در مورد خواص ضدباکتریایی کارواکرول در برابر استرپتوکوک های گروه A گزارش شده بود مطابقت دارد. MIC و MBC گزارش شده به ترتیب ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر بود (۳۲).

Sokovic و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر ضدباکتریایی اسانس ها از ده گیاه مختلف که شامل کارواکرول، تیمول و آلفاپینن بودند را در برابر باکتری های اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ ، باسیلوس سوبتیلیس، سودوموناس، پروتئوس میرابلیس با روش دیسک دیفیوژن و میکروداپلوشن برات بررسی کردند. در نتایج این مطالعه کارواکرول (MIC $0/5$ ، MBC $1/5$ میکروگرم در میلی لیتر) بالاترین فعالیت ضدباکتریایی را داشت و همچنین اسانس آویشن بسیار قوی تر از آنتی بیوتیک استرپتومايسين در برابر سویه های ذکر شده گزارش گردید. تأثیر کارواکرول بر باکتری اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ مشاهده شد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (۳۳).

همچنین در مطالعات انجام شده توسط Ben Arfa و همکاران در سال ۲۰۰۶ خواص ضد باکتریایی دو نوع مولکول مشتق از کارواکرول (کارواکرول متیل اتر و کارواکریل استات) در برابر برخی از باکتری های گرم مثبت، گرم منفی و مخمر شامل *Escherichia coli*، *Pseudomonas fluorescens*، *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* گزارش شد (۳۴).

BURT و همکاران در سال ۲۰۰۵ افزایش فعالیت مواد مؤثره گیاهی شامل کارواکرول، تیمول، y-terpinene و P-Cymene در برابر اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ را مورد ارزیابی قرار دادند که از چهار اسانس گیاهی فقط کارواکرول و تیمول در برابر این سویه تأثیر گذار بودند، MIC تیمول و کارواکرول $1/2$ میکرومول در لیتر گزارش شد (۲۵).

در مطالعه Helander و همکاران در سال ۱۹۹۸ که اثر اسانس گیاهان بر روی باکتری گرم منفی با استفاده از روش بیولومینسنس بود؛ کارواکرول و تیمول در برابر اشریشیا کلی $O_{157} : H_7$ اثر بازدارندگی نشان داد و باعث از بین رفتن لیپوپلی ساکارید و اختلال در غشاء خارجی این باکتری گردید (۲۶).

در مطالعه ای مشابه Niluni.M. Wijesundara و همکاران در سال ۲۰۲۱ اثر ضد میکروبی کارواکرول را به صورت تنها و همچنین به صورت ترکیب با چهار آنتی بیوتیک در برابر باکتری / استرپتوکوکوس پیوژنز بررسی کردند، MIC و MBC گزارش شده به ترتیب ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر بود که با نتایج آزمایشگاهی حاصل از مطالعه حاضر همخوانی دارد و کارواکرول همچنین اثر هم افزایی با کلیندامایسین و پنی سیلین نشان داد و گزارش گردید که کارواکرول می تواند به عنوان یک اسانس گیاهی بی خطر و فوق العاده قوی با مکانیسم اثر بر غشاء سلولی معرفی گردد (۸).

نتایج مطالعات ذکر شده و همچنین مطالعه حاضر نشان داد که کارواکرول و مشتقات آن دارای خواص ضد میکروبی در برابر باکتری ها و قارچ های مختلف می باشند. مطالعات متعددی در مورد مکانیسم عمل این ترکیب وجود دارد که اکثر آن ها نشان می دهد هدف اصلی کارواکرول غشاء سیتوپلاسمی باکتری ها می باشد (۸، ۲۲). کارواکرول می تواند به ساختار غشاء سلولی نفوذ کرده و قادر به تجزیه غشاء خارجی سلول های میکروبی می باشد. این آسیب غشائی توسط کارواکرول می تواند بر هومئوستاز pH و تعادل یون های معدنی تأثیر بگذارد و متعاقباً منجر به القای

فعالیت ضدباکتریایی این ماده شود (۱۸). علاوه بر این، از آنجا که غشاء سیتوپلاسمی نقش حیاتی در زنده ماندن سلول‌های پروکاریوتی دارد این تخریب غشائی می‌تواند باعث مرگ سلولی شود (۱۶، ۲۷).

مطالعات گذشته ذکر شده نشان داد که ترکیبات فنلی هم‌چون کارواکرول و تیمول، مهم‌ترین ترکیبات ضد میکروبی به‌شمار می‌روند. این اختلاف در میزان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد مطالعات مختلف، می‌تواند تفاوت در میزان ترکیبات ضدباکتریایی و روش استخراج عصاره اساس باشد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر نیز می‌توان بیان کرد که کارواکرول اثر ضد میکروبی علیه باکتری مورد آزمون را نشان داد.

مطالعات اخیر نشان داد که باکتری *شریشیا کلی* در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج مانند سفکسیم مقاوم است. در مطالعه‌ای که توسط Ayatollahi و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی *شریشیا کلی* جدا شده از کودکان در بیمارستان شهید صدوقی یزد انجام شد، میزان مقاومت بالایی برای سفکسیم (۵۷/۹ درصد) گزارش گردید (۲۸). در مطالعه دیگری در ایران که بر روی *شریشیا کلی* جدا شده از عفونت‌های مجاری ادراری (UTI) توسط Pourakbari و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام شد، مقاومت به سفکسیم (۵۰ درصد) گزارش گردید (۲۹). با توجه به نتایج این مطالعات و سایر مطالعات مشابه (۱۳) می‌توان نتیجه گرفت که سویه‌های *شریشیا کلی* به آنتی‌بیوتیک‌های رایج از جمله سفکسیم مقاوم می‌باشند.

با توجه به این‌که اثر هم‌افزایی کارواکرول و سفکسیم در برابر باکتری *شریشیا کلی* $O_{157} : H_7$ هرگز مورد بررسی قرار نگرفته است، در قسمت دیگر مطالعه حاضر اثر هم‌افزایی کارواکرول و آنتی‌بیوتیک سفکسیم علیه *شریشیا کلی* $O_{157} : H_7$ مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه حاضر کارواکرول در ترکیب با سفکسیم هم‌افزایی علیه *شریشیا کلی* $O_{157} : H_7$ نشان داد.

تا کنون مقالات متعددی در زمینه فعالیت‌های ضدباکتریایی هم‌افزایی ترکیبات مختلف گیاهی در حضور آنتی‌بیوتیک‌ها توسط محققین گزارش شده است (۳۰-۳۲).

اثرات هم‌افزایی اسید سینامیک، سینامالدئید، اوژنول، تیمول با چندین آنتی‌بیوتیک قبلاً گزارش شده است (۸). ترکیب این مواد شیمیایی گیاهی با آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند منجر به کاهش حداقل دوز مؤثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد نیاز برای درمان و در نتیجه کاهش عوارض جانبی داروها شود (۳۳).

علاوه بر این، توانایی ترکیبات مشتق شده از گیاهان در تغییر یا مسدود کردن مکانیسم مقاومت می‌باشد، به طوری که باکتری به آنتی‌بیوتیک حساس می‌شود یا آنتی‌بیوتیک در صورت استفاده در غلظت‌های پایین فعال می‌شود (۳۰-۳۲).

اثر هم‌افزایی کارواکرول نه تنها همراه با آنتی‌بیوتیک‌ها بلکه همراه با سایر ترکیبات بیولوژیکی مانند تیمول، اوژنول، نیسین و اسیدهای آلی مانند اسید استیک، اسید لاکتیک و اسید سیتریک گزارش شده است (۸).

مطالعاتی در مورد اثرات هم‌افزایی کارواکرول با آنتی‌بیوتیک‌ها وجود دارد. مطالعه دیگری مشابه مطالعه حاضر نشان داد که کارواکرول به‌طور قابل توجهی MIC اریترومایسین را در برابر استرپتوکوک‌های گروه A مقاوم به اریترومایسین کاهش می‌دهد و همچنین کارواکرول اثر هم‌افزایی با اریترومایسین نشان داد. کارواکرول به تنهایی و همچنین در ترکیب با اریترومایسین می‌تواند علیه سویه‌های مقاوم اثر بخش باشد (۲۲).

در مطالعه‌ای که توسط Pol و همکاران در سال ۱۹۹۹ انجام شد ترکیب کارواکرول و نیسین در برابر دو باکتری گرم مثبت *Listeria monocytogenes* و *Bacillus cereus* مورد ارزیابی قرار گرفت. محققین بیان کردند که کارواکرول ممکن است با افزایش تعداد یا اندازه منافذ غشاء سیتوپلاسمی که توسط نیسین ایجاد شده و همچنین طول عمر منافذ باعث افزایش فعالیت ضدباکتری نیسین شود (۳۴).

در مطالعه Sharifi و همکاران در سال ۲۰۱۸ اثر مهارکنندگی رشد اسانس‌های گیاهی با آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین بررسی شد، نتایج فنوتیپی نشان داد که اسانس گیاهی آویشن، مرزه و پونه با ترکیبات مورد مطالعه کاملاً اثر سینرژیستی دارند و نشان داد که اسانس‌های گیاهی قادرند میزان MIC آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین علیه سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را به‌صورت معنی‌داری کاهش دهند (۱۸).

در مطالعه حاضر اثر مهارکنندگی کارواکرول با آنتی‌بیوتیک سفکسیم علیه باکتری *E. coli* O₁₅₇:H₇ بررسی شد و بر اساس شاخص FIC مشخص گردید ترکیب کارواکرول و آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه علیه سوبه مذکور از نوع سینرژیستی می‌باشد. بنابراین کارواکرول را می‌توان به‌عنوان یک داروی ضد باکتریایی با منشأ طبیعی معرفی کرد. در این مطالعه هم‌افزایی کارواکرول با آنتی‌بیوتیک سفکسیم گزارش شد. اما برای یافتن این مکانیسم عمل به مطالعات بیشتری نیاز است.

نتیجه‌گیری نهایی: برای مطالعات آتی تأثیر گیاهان بومی ایران و ترکیبات تشکیل دهنده آن‌ها به‌صورت مجزا و توأم با دیگر ترکیبات ضد میکروبی همچون اسانس‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، نانوذرات و... علیه باکتری‌های پاتوژن و همچنین بررسی اثر گیاهان بومی ایران و اجزاء تشکیل دهنده آن‌ها روی تشکیل بیوفیلم/اشریشیا کلی O₁₅₇:H₇ با استفاده از تکنیک‌های وابسته به کشت سلول، کشت بافت و همچنین مدل حیوان آزمایشگاهی توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران برای تأمین اعتبار مورد نیاز مطالعه حاضر و همچنین از همکاری دکتر مهدی سلطانی، دکتر علیرضا خسروی و دکتر عقیل شریف‌زاده به پاس محبت و مساعدت‌های فراوانی که در انجام مراحل مختلف این مطالعه صورت گرفته است تشکر و قدردانی کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

- Mobarki N, Almerabi B, Hattan A. Antibiotic resistance crisis. Int J Med Dev Ctries. 2019;40(4):561-4. doi: 10.24911/IJMD.51-1549060699
- Lee JH, Kim YG, Lee J. Carvacrol-rich oregano oil and thymol-rich thyme red oil inhibit biofilm formation and the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. J Appl Microbiol. 2017;123(6):1420-8. doi: 10.1111/jam.13602 PMID: 28980415
- Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. Evid Based Complementary Altern Med. 2016; ID 3012462,21. doi: 10.1155/2016/3012462 PMID: 28090211
- Vinciguerra V, Rojas F, Tedesco V, Giusiano G, Angiolella L. Chemical characterization and antifungal activity of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* essential oils and carvacrol against *Malassezia furfur*. Natural Product Res. 2019;33(22):3273-7. doi: 10.1080/14786419.2018.1468325 PMID: 29726703
- Baranauskaitė J, Kubiliene A, Marksa M, Petrikaite V, Vitkevičius K, Baranauskas A, Bernatoniene J. The influence of different oregano species on the antioxidant activity determined using HPLC postcolumn DPPH method and anticancer activity of carvacrol and rosmarinic acid. Biomed Res Int. 2017; ID1681392. doi: 10.1155/2017/1681392 PMID: 29181386
- Barnwal P, Vafa A, Afzal S, Shahid A, Hasan S, Alpashree, Sultana S. Benzo (a) pyrene induces lung toxicity and inflammation in mice: Prevention by carvacrol. Hum Exp Toxicol. 2018;37(7):752-61. doi: 10.1177/0960327117735572 PMID: 29019276
- Singh P, Prakash O, Chandra M, Patil AR, Pant A, Isidorov VA. Reinvestigation of essential oil of *Rabdosia melissoides*: Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, antifungal and antibacterial activities. J Essent Oil-Bear Plants. 2016;19(8):1859-72. doi: 10.1080/0972060X.2016.1231597
- Wijesundara NM, Lee SF, Cheng Z, Davidson R, Rupasinghe HV. Carvacrol exhibits rapid bactericidal activity against *Streptococcus pyogenes* through cell membrane damage. Sci Rep. 2021;11(1):1-14. doi: 10.1038/s41598-020-79713-0 PMID: 33452275
- Kim Y-G, Lee J-H, Gwon G, Kim S-I, Park JG, Lee J. Essential oils and eugenols inhibit biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇. Sci Rep. 2016;6(1):1-11. doi: 10.1038/srep36377 PMID: 27808174
- Oloketuyi SF, Khan F. Strategies for biofilm inhibition and virulence attenuation of foodborne pathogen-*Escherichia coli* O₁₅₇:H₇. Curr Microbiol. 2017;74(12):1477-89. doi: 10.1007/s00284-017-1314-y PMID: 28744570

11. Fathi J, Ebrahimi F, Nazarian S, Hajizade A, Malekzadegan Y, Abdi A. Production of egg yolk antibody (IgY) against shiga-like toxin (stx) and evaluation of its prophylaxis potency in mice. *Microb Pathog.* 2020;145(1):104199. doi: [10.1016/j.micpath.2020.104199](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104199) PMID: [32320733](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32320733/)
12. Duffy G. Verocytotoxicigenic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. *J Appl Microbiol.* 2003;94:94S-103S. doi: [10.1046/j.1365-2672.94.s1.11.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.94.s1.11.x) PMID: [12675941](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12675941/)
13. Galland JC, Hyatt DR, Crupper SS, Acheson DW. Prevalence, antibiotic susceptibility, and diversity of *Escherichia coli* O₁₅₇: H₇ isolates from a longitudinal study of beef cattle feedlots. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(4):1619-27. doi: [10.1128/AEM.67.4.1619-1627.2001](https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1619-1627.2001) PMID: [11282614](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11282614/)
14. Silva DM, Costa PA, Ribon AO, Purgato GA, Gaspar D-M, Diaz MA. Plant extracts display synergism with different classes of antibiotics. *An Acad Bras Cienc.* 2019;91(2):e20180117. doi: [10.1590/0001-3765201920180117](https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180117) PMID: [31090789](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31090789/)
15. Trevisan DAC, Silva AFd, Negri M, Abreu BAd, Machinski M, Patussi EV, Campanerut- Sá PAZ, Mikcha JMG. Antibacterial and antibiofilm activity of carvacrol against *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Braz J Pharm Sci.* 2018;54(1):e17229. doi: [10.1590/s2175-97902018000117229](https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000117229)
16. Khan I, Bahuguna A, Kumar P, Bajpai VK, Kang SC. Antimicrobial potential of carvacrol against uropathogenic *Escherichia coli* via membrane disruption, depolarization, and reactive oxygen species generation. *Front Microbiol.* 2017;8:2421. doi: [10.3389/fmicb.2017.02421](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02421) PMID: [29270161](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29270161/)
17. Khampiang T, Wnek GE, Supaphol P. Electrospun DOXY-h loaded-poly (acrylic acid) nanofiber mats: in vitro drug release and antibacterial properties investigation. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2014;25(12):1292-305. doi: [10.1080/09205063.2014.929431](https://doi.org/10.1080/09205063.2014.929431) PMID: [24945329](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24945329/)
18. Sharifi A, Ahmadi A, Mohammadzadeh A. *Streptococcus pneumoniae* quorum sensing and biofilm formation are affected by *Thymus daenensis*, *Satureja hortensis*, and *Origanum vulgare* essential oils. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2018;65(3):345-59. doi: [10.1556/030.65.2018.013](https://doi.org/10.1556/030.65.2018.013) PMID: [29471691](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29471691/)
19. Azizi-Lalabadi M, Ehsani A, Divband B, Alizadeh-Sani M. Antimicrobial activity of Titanium dioxide and Zinc oxide nanoparticles supported in 4A zeolite and evaluation the morphological characteristic. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-10. doi: [10.1038/s41598-019-54025-0](https://doi.org/10.1038/s41598-019-54025-0) PMID: [31767932](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31767932/)
20. Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason Sonochem.* 2001;8(3):303-13. doi: [10.1016/S1350-4177\(01\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2) PMID: [11441615](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11441615/)
21. Percival SL, Hill KE, Williams DW, Hooper SJ, Thomas DW, Costerton JW. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair Regen.* 2012;20(5):647-57. doi: [10.1111/j.1524-475X.2012.00836.x](https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2012.00836.x) PMID: [22985037](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22985037/)
22. 1. Magi G, Marini E, Facinelli B. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A *Streptococci*. *Front Microbiol.* 2015;6:165. doi: [10.3389/fmicb.2015.00165](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00165) PMID: [25784902](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25784902/)
23. Soković M, Glamočlija J, Marin PD, Brkić D, Van Griensven LJ. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules.* 2010;15(11):7532-46. doi: [10.3390/molecules15117532](https://doi.org/10.3390/molecules15117532) PMID: [21030907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21030907/)
24. Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett Appl Microbiol.* 2006;43(2):149-54. doi: [10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x) PMID: [16869897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16869897/)
25. Burt SA, Vlieland R, Haagsman HP, Veldhuizen EJ. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O₁₅₇: H₇ by addition of food stabilizers. *J Food Prot.* 2005;68(5):919-26. doi: [10.4315/0362-028X-68.5.919](https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.5.919) PMID: [15895722](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15895722/)
26. Helander IM, Alakomi H-L, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, Wright Av. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J Agric Food Chem.* 1998;46(9):3590-5. doi: [10.1021/jf980154m](https://doi.org/10.1021/jf980154m)
27. Wang L-H, Wang M-S, Zeng X-A, Zhang Z-H, Gong D-M, Huang Y-B. Membrane destruction and DNA binding of *Staphylococcus aureus* cells induced by carvacrol and its combined effect with a pulsed electric field. *J Agric Food Chem.* 2016;64(32):6355-63. doi: [10.1021/acs.jafc.6b02507](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02507) PMID: [27420472](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27420472/)
28. Ayatollahi J, Shahcheraghi S, Akhondi R, Soluti S. Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from children in Shahid Sadoughi Hospital of Yazd. Iran *J Pediatr Hematol.* 2013;3(2):78. PMID: [24575257](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24575257/)

29. Pourakbari B, Ferdosian F, Mahmoudi S, Teymuri M, Sabouni F, Heydari H, Haghi Ashtiani MT, Mamishi S. Increase resistant rates and ESBL production between *E. coli* isolates causing urinary tract infection in young patients from Iran. *Braz J Microbiol.* 2012;43:766-9. doi: [10.1590/S1517-83822012000200041](https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000200041) PMID: 24031888
30. Li S, Mou Q, Xu X, Qi S, Leung PH. Synergistic antibacterial activity between penicillanols and antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *R Soc Open Sci.* 2018;5(5):172466. doi: [10.1098/rsos.172466](https://doi.org/10.1098/rsos.172466) PMID: 29892433
31. Mgbeahuruike EE, Stålnacke M, Vuorela H, Holm Y. Antimicrobial and synergistic effects of commercial piperine and piperlongumine in combination with conventional antimicrobials. *Antibiotics.* 2019;8(2):55. doi: [10.3390/antibiotics8020055](https://doi.org/10.3390/antibiotics8020055) PMID: 31060239
32. Sanhueza L, Melo R, Montero R, Maisey K, Mendoza L, Wilkens M. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PloS one.* 2017;12(2):e0172273. doi: [10.1371/journal.pone.0172273](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172273) PMID: 28235054
33. Ceysens P-J, Van Bambeke F, Mattheus W, Bertrand S, Fux F, Van Bossuyt E, Damée S, Nyssen HJ, Craeye SD, Verhaegen J. Molecular analysis of rising fluoroquinolone resistance in Belgian non-invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates (1995-2014). *PloS one.* 2016;11(5):e0154816. doi: [10.1371/journal.pone.0154816](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154816) PMID: 27227336
34. Pol I, Smid E. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol.* 1999;29(3):166-70. doi: [10.1046/j.1365-2672.1999.00606.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00606.x) PMID: 10530038