



The Study of Inhibition Effects *Satureja khuzestanica* Essence against Gene Expression *bap* *Acinetobacter baumannii* with Real time PCR Technique

Abbas Bahador¹, Hossein Saghi², Ramazanali atae kachoei³, Davoud Esmaili³

1. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. AJA University of Medical Sciences, Tehran, IR Iran

3. Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2014/07/21

Accepted: 2015/01/11

Available online: 2015/03/30

Article Subject:

Antimicrobial Agents

IJMM 1394; 9(1): 42-49

Corresponding author at:

Dr. Davoud Esmaili

Molecular Biology Research
Center, Baqiyatallah University
of Medical Sciences, Tehran,
Iran

Email:

esm114@gmail.com

Abstract

Background and Aim: *Acinetobacter baumannii* a major hospital pathogens and causes outbreaks of infections and associated to nosocomial infections, including bacteremia, pneumonia, meningitis, urinary tract infection, and wound infections. *Satureja khuzestanica* province the group Nnayyan and Carvacrol and thymol are antimicrobial activity of this plant. Biofilm-related genes (*bap*)-specific proteins on the cell surface generate a direct role in biofilm formation and infection of the bacteria is eliminated. The aim of this study was to investigate the effect of alcoholic extract *Satureja khuzestanica* in gene expression (*bap*) was *A. baumannii* if it can be as effective as a complementary treatment or therapy in infections caused by these bacteria and inhibit virulence genes used.

Materials and Methods: In this study the effect of *Satureja khuzestanica* essence, an endemic plant of Iran, on the expression level of *bap* gene in *A. baumannii* were investigated. For this purpose, MIC was determined for *A. baumannii*. Then, bacteria were treated with *S. khuzestanica* essence. The *bap* genes expression in treated and non-treated bacteria, before and after treatment was evaluated using Real time PCR technique.

Results: Surprisingly, the expression level of *bap* gene was decreased in the presence of *S. khuzestanica*. However, the expression of DNA *gyrA* gene that was used as an internal control was not altered before and after treatment with this herb.

Conclusions: Based on the results, *S. khuzestanica* could play a, major role in lowering the *A. baumannii* resistance to drugs, by reducing *bap* gene expression. According to results of current research we hope in future be used it to the clinic with a wider range as a complementary therapy and also for surgery operation.

Key Words: *Acinetobacter baumannii*, *bap* gene, Real time PCR

Copyright © 2015 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Bahador A, Saghi H, Atae R, Esmaili D. The Study of Inhibition Effects *Satureja khuzestanica* Essence against Gene Expression *bap* *Acinetobacter baumannii* with Real time PCR Technique. Iran J Med Microbiol. 2015; 1394 (1) :42-49

بررسی تاثیر اسانس الکی گیاه مرزه خوزستانی بر روی بیان ژن مرتبط با بیوفیلیم

اسینتوباکتر بومانی (*bap*) به روش Real time PCRعباس بهادر^۱، حسین ساقی^۲، رمضانعلی عطایی کچوئی^۳، داود اسماعیلی^۳

۱. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۲. دانشکده پرستاری، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران.

۳. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی و گروه میکروبی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: اسینتوباکتر بومانی یکی از پاتوژن های اصلی بیمارستانی است و انواع متفاوتی از عفونت ها شامل پنومونی، مننژیت و عفونت های مرتبط با خون را ایجاد می کند. مرزه خوزستانی از تیره نعنائیان بوده و عمده فعالیت ضد میکروبی این گیاه اساساً به دلیل اجزای فنی اصلی آن کارواکرول و تیمول می باشد. ژن مربوط به بیوفیلیم (*bap*) پروتئین های اختصاصی در سطح سلول را تولید می کند که مستقیماً در تشکیل بیوفیلیم و عفونت زایی این باکتری نقش اصلی را دارد. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر اسانس الکی مرزه خوزستانی در بیان ژن مرتبط با بیوفیلیم/اسینتوباکتر بومانی بوده تا در صورت موثر بودن بتوان از آن به عنوان درمان یا مکمل درمانی در عفونت های ناشی از این باکتری و مهار ژن ویروالانس استفاده نمود.

مواد و روش کار: در مطالعه حاضر ابتدا میزان MIC اسانس الکی مرزه خوزستانی به روش ماکرودایلوشن علیه سویه های اسینتوباکتر بومانی که واجد ژن *bap* می باشند بدست آمد. پس از مواجهه به میزان غلظت MIC اسانس، تغییرات بیان این ژن به روش Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: آنالیز اسانس الکی مرزه خوزستانی نشان دهنده حضور ۹۰/۸٪ کارواکرول می باشد. اسانس الکی این گیاه دارای MIC ۰/۳ (mg/ml) می باشد. پس از انجام Real time PCR نتایج حاصل از Ct های بدست آمده با نرم افزار spss و آزمون one way ANOVA آنالیز شده و تفاوت معنی داری بین *Ct Vales* و *Log₁₀ Template molecules* به میزان ($P > 0.05$) مشاهده گردید.

نتیجه گیری: نتایج نشان دهنده کاهش بیان ژن *bap* در شرایط *in vitro* به روش Real time PCR می باشد، ولی تاثیری بر بیان ژن *Housekeeping DNA gyrase-A* ندارد. با توجه به تاثیر مهاری اسانس مرزه خوزستانی علیه ژن بیوفیلیم/اسینتوباکتر بومانی احتمالاً بتوان از این اسانس به عنوان مکمل درمانی علیه این باکتری و مهار ژن ویروالانس آن استفاده نمود.

کلمات کلیدی: اسینتوباکتر بومانی، *bap*، Real time PCR

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۳/۰۴/۳۱

پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۲۱

انتشار آنلاین: ۱۳۹۴/۰۱/۱۰

موضوع:

مواد ضد میکروبی

IJMM 1394; 9(1): 42-49

نویسنده مسئول:

دکتر داود اسماعیلی

مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی و گروه میکروبی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران.

تلفن: ۰۹۸۹۱۰۴۵۱۷۶۰۴

پست الکترونیک:

esm114@gmail.com

مقدمه

یکی از عوامل مهم در عفونت ها از جمله (باکتری، مننژیت، پنومونی، عفونت مجاری ادراری، پریتونیت، سپتی سمی) به شمار می رود (۲). اسینتوباکتر بومانی شایع ترین گونه ای است که از خون، خلط، پوست، مایع جنب، ادرار و حلق انسان قابل

اسینتوباکتر بومانی، کوکوباسیل گرم منفی، هوازی اجباری، غیر متحرک، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بوده و به طور وسیعی در خاک، آب و پوست انسان یافت می شود (۱). این باکتری از آلوده کننده های شایع محیط های آزمایشگاهی بوده و

مواد و روش‌ها

جمع آوری سویه های مورد مطالعه

در این تحقیق سویه های *اسینتوباکتر بومانی* مورد مطالعه از نمونه های بالینی (خون، ادرار، زخم، خلط و مایع مغزی نخاعی) بخش مراقبت های ویژه (ICU) بیمارستان های منتخب شهر تهران در نیمه اول سال ۱۳۹۲ جداسازی شده و با استفاده از روش های استاندارد میکروب شناسی تعیین هویت شدند (۱۲). حضور ژن *bap* با تکنیک PCR تایید شد. در کنار نمونه های بالینی از سویه استاندارد و رفرانس *Acinetobacter baumannii ATCC19606* نیز استفاده شد که این عمل موجب می شود تا شرایط آزمایش از لحاظ کیفیت تحت کنترل باشد.

PCR جهت تایید ژن *bap*

باکتری های مورد نظر با استفاده از روش های استاندارد میکروب شناسی (رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز و تست های بیوشیمیایی) شناسایی شدند. حضور ژن *bap* با استفاده از کیت شرکت سیناژن نمایندگی فرمنتاز به روش ملکولی PCR تایید شد. مخلوط واکنش جهت PCR ژن *bap* به صورت زیر است.

Master Mix (1x): 12.5 μ l, Primer F (0.1 - 1 μ M) 1 μ l,
Primer R (0.1 - 1 μ M): 1 μ l, Template DNA: 5 μ l (20pg),
Sterile Deionized Water: 5.5 μ l, حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر

راه اندازی PCR برای تشخیص ژن *bap* طبق روش زیر اجرا شد.

Initial denaturation, 95°C, 120s, 1cycle, denaturation,
93°C, 45s, 35cycle, Annealing, 57°C, 60s, 35cycle,
Extension, 72°C, 30s, 35cycle, Final Extension, 72°C,
90s, 1cycle.

پرایمر های مورد استفاده برای ژن *bap* شامل
F: 5'-TGCTGACAGTGACGTAGAACCACA-3'
و R: 5'-TGCAACTAGTGAATAGCAGCCCA-3'

پرایمر های ژن DNA gyrase A

F: 5'-AAGGCCGTCCAATCGTGAA<T>-3'
و R: 5'-AACCGTACCAGAAGCTGTG<G>-3' می باشد.
طول قطعه تکثیر برای ژن *bap* ۱۲۱ جفت باز و برای ژن
DNA gyrase A ۱۱۰ جفت باز می باشد. در نهایت پنج گونه

جداسازی است (۴،۳). قرار دادن سوند ادراری و استفاده از کاتتر داخل عروقی از عوامل ایجاد کننده باکتری می توسط این باکتری و سپتی سمی در بیماران سوختگی با ضعف سیستم ایمنی می باشد (۵). افراد مبتلا به سیستیک فیبروزیس، نوتروپنی، نقص سیستم ایمنی حاصل از درمان و یا شکسته شدن سدهای دفاعی بدن که به طور نرمال از جمله باکتری ها جلوگیری می کنند در معرض خطر عفونت با این باکتری هستند. از مهمترین عوامل در اپیدمی این باکتری توانایی تشکیل بیوفیلم، مقاومت پادزیستی بالا، توانایی زنده ماندن در محیط های زنده و غیر زنده و توانایی انتقال توسط پرسنل، تجهیزات بیمارستانی، هوا و جابجا شدن بیمار در بخش های مختلف بیمارستان می باشد (۶). در مطالعات انجام شده، *اسینتوباکتر بومانی* به عنوان مهمترین پاتوژن در سپتی سمی های بیمارستانی نوزادان نیز گزارش شده است (۷). درمان عفونت های ناشی از این پاتوژن به دلیل مقاومت قابل توجه آن به طیف وسیعی از پادزیست ها بسیار دشوار است (۸،۹). مشکلات درمانی ناشی از این باکتری و امکان انتقال بین موجودات زنده و غیر زنده، توانایی تشکیل بیوفیلم و همچنین ماندگاری طولانی مدت در محیط بیمارستان باعث افزایش ظهور این باکتری و عفونت روز افزون ناشی از آن شده است (۱۰). تشکیل بیوفیلم یکی از مهمترین اشکال بیماریزایی بسیاری از باکتری ها است که در ایجاد کلنی از مواد جانشین شونده را تسهیل می کند و به مقاومت دارویی و فرار از سیستم ایمنی میزبان در محیط زنده کمک می کند. مطالعات گسترده درباره عوامل دخیل در تشکیل بیوفیلم *اسینتوباکتر بومانی*، نشان دهنده وجود ژن *bap* (Protein Biofilm Associated) در این باکتری است.

گیاه مرزه خوزستانی از تیره نعنائیان بوده و گیاه بومی مناطق گرم و معتدل زاگرس می باشد. این گیاه و ترکیبات آن موضوع تحقیق چندین محقق بوده است و فعالیت ضد میکروبی آن نیز به اثبات رسیده است. عمده فعالیت ضد میکروبی این گیاه اساساً به دلیل اجزای فنلی اصلی آن یعنی کارواکرول و تیمول می باشد (۱۱). از ویژگی های متمایز کننده این گیاه وجود ۹۴٪ کارواکرول در اسانس آن است، در حالیکه میزان کارواکرول در اسانس گیاهان دیگر حداکثر ۴۰٪ می باشد (۱۱). مرزه خوزستانی دارای اثرات ضد میکروبی بر روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی از قبیل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوک اپیدرمیدیس*، *سالمونلاتیفی موربوم* و *اشریشیا کلی* می باشد (۱۱).

نوترینت برات کشت داده شد. سپس از کشت تازه سوسپانسیون تازه معادل کدورت نیم مک فارلند تهیه شد. برای بررسی کدورت معادل نیم مک فارلند از روش مقایسه لوله شاهد مک فارلند که به روش CLSI آماده شده بود و همچنین از روش اندازه گیری OD لوله های مورد نظر در طول موج 400nm و میزان باکتری مورد استفاده برای کشت با استفاده از نمودار استاندارد بدست آمد (۱۵).

سپس به ۳۰ لوله آزمایش استریل که حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت نوترینت برات بود به میزان نیم مک فارلند از باکتری اضافه کرده و سپس رقت های (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹، ۱، ۱/۱، ...، ۳) از اسانس های گیاهی در DMSO (دی متیل سولفوکساید) حل شده بودند به لوله های آزمایش اضافه شد.

ایزوله های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* در غلظت های مختلف از اسانس های گیاه مورد استفاده حساس بوده اند و این غلظت ها حداقل غلظتی از اسانس ها بوده اند که مانع رشد ایزوله ها شده اند و هیچ رشدی از ایزوله ها در لوله کنترل منفی مشاهده نگردید. کلیه این مراحل در زیر هود میکروب شناسی و در کنار شعله و با رعایت کلیه شرایط استریل انجام شد. لوله های آزمایش بعد از اضافه کردن اسانس های گیاهی به آرامی مخلوط شده و در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه گردید.

بعد از زمان انکوباسیون در دمای ۳۷ °C جهت تعیین MIC، با استفاده از سوآپ پنبه ای استریل از کلیه لوله ها در محیط کشت مولر هینتون آگار به صورت متراکم کشت داده شد و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید. بعد از اتمام زمان انکوباسیون آخرین رقت از لوله های حاوی *اسینتوباکتر بومانی* و اسانس گیاهی که در محیط مولر هینتون آگار دارای رشد بوده و رقت بالاتر از آن فاقد رشد بوده به عنوان MIC اسانس گیاه محاسبه شد.

تیمار نمونه های *اسینتوباکتر بومانی* با اسانس مرزه خوزستانی

برای بررسی اثرات اسانس گیاه مرزه خوزستانی در بیان ژن های مورد نظر، ابتدا باید نمونه های *اسینتوباکتر بومانی* با اسانس گیاه تیمار شده و بعد از استخراج RNA به بررسی آن پرداخته شود. برای این کار برای هر نمونه *اسینتوباکتر بومانی* مورد مطالعه

اسینتوباکتر بومانی واجد ژن *bap* جهت مطالعات ملکولی انتخاب گردید (۱۳).

تهیه اسانس مرزه خوزستانی

اسانس های گیاه مرزه خوزستانی از سرشاخه های گلدار گیاه و با روش تقطیر در بخار آب (Steam distillation) تهیه شد و تا زمان انجام آزمایش در یخچال ۴ °C نگه داری شد (۱۴).

تجزیه اسانس

آنالیز اسانس مرزه خوزستانی توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) با مشخصات ستون polydimethyl siloxane fused silica %95 phenyl: %5 BP-5 (30m*0.25mm Internal diameter, capillary column 0.25µm film thickness) و گاز حامل هلیوم با درجه خلوص ۹۹/۹۹٪ در آزمایشگاه باریج اسانس کاشان انجام شد. نتایج GCmass در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: نتایج GCmass اسانس مرزه خوزستانی

S.No	Compound	RT ^a	RT ^b	%
1.	α-Pinene	4.081	935	0.28
2.	β-Myrcene	5.158	990	0.39
3.	α-Terpinene	5.77	1016	0.49
4.	P-Cymene	5.964	1023	3.11
5.	β-Phellandrene	6.067	1027	0.19
6.	γ-Terpinene	6.828	1056	1.24
7.	Linalool	7.944	1098	0.91
8.	Borneol	9.89	1162	0.35
9.	Terpinene-4-01	10.26	1173	0.65
10.	Thymol	13.992	1291	0.19
11.	Carvacrol	14.164	1296	90.88
12.	(z)- Caryophyllene	17.757	1413	0.15
13.	β-Bisabolene	20.464	1502	0.21
14.	Caryophyllene oxide	22.57	1574	0.18

^aRT:Retention time (min),^bRT:Retention indices determind on HP-5MS capillary coium, °C,Calculated from TIC data

تعیین MIC (Minimum Inhibitory concentration)

اسانس گیاهان مرزه خوزستانی

برای تعیین MIC اسانس گیاه مرزه خوزستانی ابتدا از سوبیه های *اسینتوباکتر بومانی* مورد مطالعه در محیط کشت

گردید. نتیجه حاصل از الکتروفورز محصول PCR نمونه cDNA روی ژل آگارز در شکل ۱ نشان داده شده است.

سنتز cDNA

برای ساخت cDNA از کیت RT PCR شرکت سیناژن با product Code: RTPL12 استفاده شد. سپس نمونه ها جهت انجام Real time PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

انجام Real time PCR

برای تعیین میزان بیان ژن های *bap* و DNA Gyrase از تکنیک Real time PCR استفاده گردید. کارایی و میزان T_m این پرایمرها توسط نرم افزار Allele ID مورد بررسی قرار گرفته و تایید گردید. موارد مورد نیاز جهت انجام Real time PCR برطبق پرتکل کیت SYBR Green Master Mix شرکت Fermentase و بر طبق جدول زیر در پلیت های ۳۶ خانه ای مخصوص دستگاه Corbett انجام گردید. قطعه تکثیر در مورد ژن *bap* شامل ۱۲۱ نوکلئوتید و در مورد ژن DNA Gyrase A ۱۱۰ نوکلئوتید می باشد. دمای Annealing در مورد ژن *bap* 57°C و در مورد ژن DNA Gyrase A $51/8^{\circ}\text{C}$ تعیین گردید. در جدول ۲ آماده سازی نمونه های Real time PCR و در جدول ۳ شرایط انجام Real time PCR آورده شده است.

جدول ۲: آماده سازی نمونه های Real time PCR

حجم	غلظت نهایی	مواد
12.5 μl	1x	qPCR SYBR Green Master Mix
0.05 μl	1x	ROX dye 50x
1 μl	(0.1 - 1 μM)	F Primer
1 μl	(0.1 - 1 μM)	R Primer
1 μl	1 μg	Template
9.45 μl	-	D.W
25 μl	-	Total volume

به میزان معادل نیم مک فارلند از آن در لوله آزمایش حاوی ۵ میلی لیتر محیط نوترینت برات کشت داده شد. در ادامه به هر کدام از لوله ها معادل MIC حاصل از اسانس ها اضافه شد. بعد از مخلوط کردن آنها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شد. بعد از انکوباسیون نمونه ها جهت استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفته اند.

استخراج RNA

برای استخراج RNA از کیت Cinnapure RNA با cat. No: PR891620 شرکت سیناژن استفاده گردید. سپس اندازه گیری غلظت RNA ها توسط دستگاه نانودرآپ انجام و نمونه ها در دمای 80°C درجه سلسیوس قرار داده شدند.

تیمار کردن توتال RNA نمونه های اسینتوباکتر بومانی قبل و بعد از مجاور سازی با اسانس گیاه مرزه خوزستانی توسط آنزیم Dnase

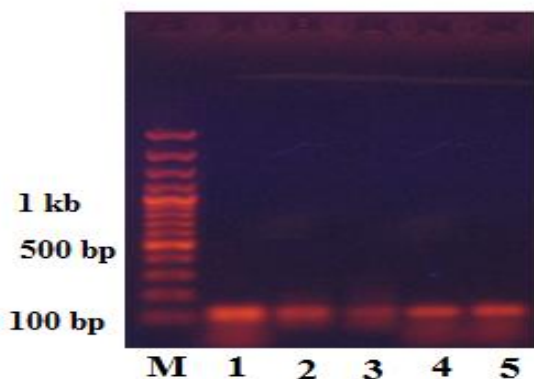
باتوجه به اینکه برای تبدیل RNA به cDNA و انجام Real time PCR، نمونه های RNA می بایست عاری از آلودگی با DNA ژنومی باشد، قبل از سنتز cDNA تمامی نمونه ها با آنزیم DNase تیمار شدند. تیمار RNA با استفاده از کیت Fermentas و طی فرایند دو مرحله ای انجام شد. به یک میکروتیوب استریل عاری از نوکلئاز یک میکروگرم RNA اضافه شد. سپس یک میکرولیتر 10x DNase1 reaction buffer و یک میکرولیتر RNase-free به میکروتیوپ ها اضافه شد و میکروتیوپ ها به مدت ۳۰ دقیقه در 37°C انکوبه گردید. در نهایت یک میکرولیتر EDTA ۲۵ میلی مولار به هر میکروتیوب اضافه و میکروتیوپ ها به مدت ۱۰ دقیقه در 65°C قرار داده شدند. غلظت RNA نمونه های استخراج شده بعد از تیمار با DNase توسط دستگاه نانودرآپ اندازه گیری شد. بعد از تایید صحت RNA و حذف DNA های اضافی موجود به سرعت همه نمونه های RNA به cDNA تبدیل و صحت تبدیل آن توسط انجام الکتروفورز ژل آگارز تایید شد.

بررسی بیان ژن *bap*

نمونه های RNA سوبه های پاتوژن پس از کیفیت سنجی با دستگاه نانو درآپ بلافاصله cDNA تهیه گردید. صحت انجام واکنش cDNA سازی از طریق انجام PCR روی ژل آگارز تایید

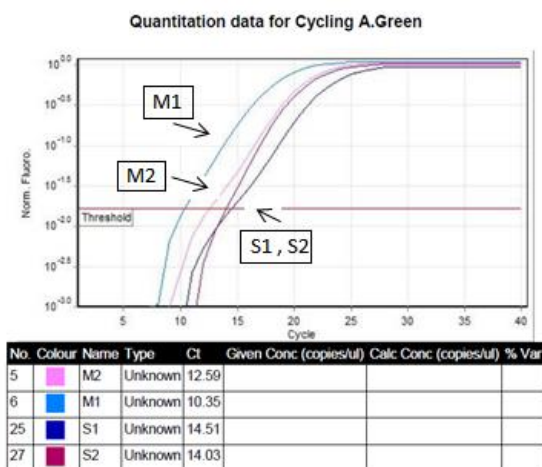
جدول ۳: شرایط انجام Real time PCR

Initial activation	Denaturation	Annealing	Extension	Repeat	Final Extension
۹۵ °C	۹۵ °C	-	۷۲ °C	۴۰ سیکل	۷۲ °C
۱۰ دقیقه	۲۰ ثانیه	۲۰ ثانیه	۲۰ ثانیه	-	۱ دقیقه



شکل ۱: ستون ۱ و ۲ محصول PCR ژن *bap*، ستون ۳ محصول PCR ژن *DNA gyrase A* و ستون ۴ محصول PCR ژن *DNA gyrase A* استاندارد و ستون ۵ (مارکر 100 bp) نمایش داده شده است. طول قطعه تکثیر شده برای ژن *bap*، 121 bp و برای ژن *DNA gyrase A* 110 bp است.

شکل ۲ نمودار تکثیر ژن *bap* در قبل و بعد از تیمار با اسانس مرزه خوزستانی و نمودار پیشرفت واکنش ژن *DNA gyrase A* به عنوان ژن *Housekeeping* به همراه جدول مقادیر *Ct* محاسبه شده را نشان می دهد. M1 ژن *bap* قبل از تیمار با اسانس، M2 ژن *bap* بعد از تیمار با اسانس، S1 ژن *Housekeeping* قبل از تیمار با اسانس، S2 ژن *Housekeeping* بعد از تیمار با اسانس مرزه خوزستانی را نشان می دهد.



شکل ۲: نمودار تکثیر ژن *bap*

تعیین کمی بیان ژن *bap* قبل و بعد از مجاورت با غلظت های مورد نظر اسانس گیاه مرزه خوزستانی با استفاده از تکنیک Real time PCR

پس از انجام Real time PCR از چندین طریق می توان کمیت سنجی نسبی را انجام داد. از جمله : استفاده از منحنی استاندارد یک ژن، استفاده از منحنی استاندارد هردو ژن، و روش ΔCt . پیش فرض روش ΔCt برای نسبی کارایی واکنش تکثیر cDNA با دو پرایمر مزبور است. با توجه با برابری کارایی تکثیر دو پرایمر در مطالعه حاضر، کمیت سنجی نسبی cDNA ژن های مورد بررسی در مقایسه با cDNA ژن *DNA Gyrase A* (ژن مرجع داخلی) به روش ΔCt انجام شد.

یافته ها

آنالیز اسانس مرزه خوزستانی نشان داد که ترکیبات Carvacrol (۹۰/۸۸٪)، P-Cymene (۳/۱۱٪)، γ -Terpinene (۱/۲۴٪)، Thymol (۰/۱۹٪) و Terpinene-4-01 (۰/۶۵٪) وجود دارد. نتایج MIC اسانس مرزه خوزستانی در مواجهه با سویه های مقاوم به دارو و واجد ژن مرتبط با بیوفیلیم (*bap*) *اسینتوباکتر بومانی* به ترتیب ۰/۲، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۲، ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم در میلی لیتر بدست آمد.

نتیجه حاصل از الکتروفورز محصولات PCR ژن *bap* روی ژل آگارز در شکل ۱ نشان داده شده است.

همانطوری که مشاهده می شود اسانس مرزه خوزستانی ۲۴/۲۵ برابر باعث کاهش بیان ژن *bap* شده است، ولی هیچ تاثیری بر روی بیان ژن Housekeeping DNA Gyrase-A نداشته است.

بحث و نتیجه گیری

در بیست سال اخیر کنترل عفونت های ناشی از باکتری های گرم منفی که اغلب به صورت عفونت های بیمارستانی می باشد، به صورت یک مشکل عمده بروز کرده است. از سال ۱۹۷۰ به بعد عفونت های بیمارستانی ایجاد شده بوسیله باکتری های خانواده انتروباکتریاسیه با مقاومت چند گانه افزایش یافته است. با ادامه استفاده از پادزیست گسترش این نوع از عفونت، باکتری گرم منفی هوازی نظیر *اسینتویاکتر*، *سودوموناس* و *استنوتروفوموناس* را نیز در بر گرفته است (۱۸،۲۱).

عفونت های *اسینتویاکتر بومانی* از سه جنبه ابتلاء، مرگ و میر و خسارت های اقتصادی حائز اهمیت هستند. افزایش مقاومت به انواع پادزیست ها باعث افزایش مرگ و میر و طول مدت اقامت در بیمارستان به دنبال اکتساب عفونت های بیمارستانی می شود. مصرف بیش از حد پادزیست ها باعث اتلاف منابع مالی نیز می گردد به نحوی که ۲۰ تا ۵۰٪ کل هزینه های دارویی بیمارستان ها را شامل می شود (۱۹).

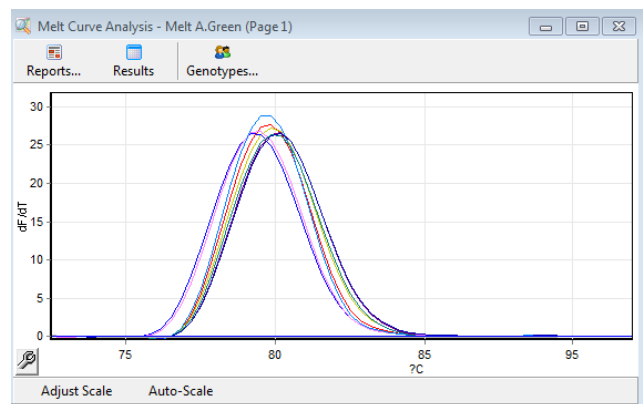
متأسفانه در کشور ما به معضل عفونت بیمارستانی با *اسینتویاکتر بومانی* آن چنان که شایسته است پرداخته نشده است ولی با توجه به مطالعات انجام شده میزان شیوع و بروز عفونت بیمارستانی با *اسینتویاکتر بومانی* در حد بالایی برآورد شده است (۲۰).

در این تحقیق سویه ها واجد ژن *bla^{OXA-23}* مورد بررسی قرار گرفتند که نشان می دهد مرزه خوزستانی واجد خاصیت مهارتی ژن بیوفیلیم در سویه های واجد بتالاکتاماز می باشد (۲۶).

مطالعات مختلفی در مورد اثرات ضد باکتریایی اسانس گیاه مرزه خوزستانی و برخی از ترکیبات شناخته شده مهم در اسانس این گیاه از جمله کارواکرول و تیمول وجود دارد (۲۲).

در مطالعه Yin در سال (۲۰۱۲) اثرات ضد التهابی و پیش آپوپتوتیک کارواکرول بر روی hepatocellular carcinoma cell

کنترل های فاقد الگو (NTCS (No Template Controls) فاقد نمودار پیشرفت واکنش بوده ولی نمونه های مورد بررسی دارای نمودار تکثیر نمایی بوده و تکثیر صورت گرفته است. در مقایسه نمودار تکثیر قبل و بعد از مواجهه با اسانس مشخص شد که میزان ΔCT افزایش یافته است (شکل ۲). *Ct* ژن DNA Gyrase-A در قبل و بعد از تیمار به ترتیب ۱۴/۵۱ و ۱۴/۰۳ بدست آمد. با توجه به اینکه اختلاف *Ct* قبل و بعد از تیمار با اسانس مرزه خوزستانی تنها ۰/۴۸ اختلاف دارد و این اختلاف ناچیز بوده بنابراین از ژن DNA Gyrase-A به عنوان ژن خانگی و استاندارد داخلی استفاده شده است.



شکل ۳: منحنی ذوب ژن *bap*

نتایج مربوط به منحنی ذوب ژن *bap* در سویه بالینی *اسینتویاکتر بومانی* تیمار شده با اسانس مرزه خوزستانی نشان داده شده است که peak اصلی برای ژن *bap* در دمای ۷۹ الی ۸۰ درجه سلسیوس رخ می دهد (شکل ۳). نتایج ΔCT ژن *bap* در مواجهه با اسانس مرزه در جدول آورده شده است.

برای تعیین میزان بیان ژن *bap* از روش PFAFFL استفاده شد. در این روش فرض بر این است که بازده نمونه و کنترل داخلی برابر ۱۰۰ درصد واز فرمول $2^{-\Delta\Delta C_T}$ به منظور بررسی بیان ژن استفاده شد (۱۷).

$$\text{Ratio} = \frac{\Delta CT \text{ target (Control -sample) (Etarget)}}{\Delta CT \text{ ref (Control- Sample) (Eref.)}}$$

$$\text{Ratio} = 10.35 - 12.59 / 14.51 - 14.03 = 2.24 / 0.48 = 4.6$$

$$C_T = 2^{4.6} = 24.25$$

با توجه به نفوذ مناسب اسانس این گیاهان به داخل باکتری محققین در سراسر دنیا از آن جهت مهار بیان ژن، آپوپتوزیس و مهار تکثیر ژن های سرطانی استفاده نمودند. ما نیز در این مطالعه در تست های اولیه ثابت نمودیم این ماده دارای اثر مهاری بر روی *اسینتوباکتر بومانی* XDR و MDR را دارا می باشد.

با مطالعه این اسانس بر روی سایر ژن های ویروالانس *اسینتوباکتر بومانی* و مطالعه نتایج حاصل می توان از اسانس این گیاه در آینده با مطالعات آزمایشگاهی و Animal study به عنوان درمان و یا مکمل درمانی به صورت پماد یا افزودنی ها به ماده غذایی بیماران و همچنین به عنوان ضد عفونی کننده دست و محیط برای جلوگیری از انتشار عفونت ناشی از این باکتری در محیط های بیمارستان استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از پشتیبانی مرکز تحقیقاتی بیولوژی مولکولی و گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا. (عج) صورت گرفته است. بدینوسیله از گروه میکروب شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی و ویروس شناسی تشکر و قدردانی می شود.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروب شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

line HepG-2 انجام شد و مشاهده گردید که کارواکرول خاصیت ضد سرطان کبد را از خود نشان می دهد (۲۳).

در مطالعه Eunkyung Kim در سال (۲۰۱۳) بیان گردید که کارواکرول می تواند بیان ژن های SREBP1c, FAS, LXR α , leptin را کاهش داده و از طرفی قادر به افزایش بیان ژن SIRT1 شود. نتایج این مطالعه نشان دهنده آن است که کارواکرول بیان ژن های دخیل در متابولیسم چربی ها را تعدیل و تنظیم می کند (۲۴).

در تحقیق Esmaeili و همکاران (۲۰۱۲) اثر مهاری مرزه خوزستانی بر روی ژنهای اگزو آنزیم S، اگزوتوکسین A، سیستم های ترشچی و افلوکس پمپ های آنتی بیوتیکی *سودوموناس آئروژینوزا* با تکنیک RT-PCR نیمه کمی بررسی گردید و مشخص گردید که دارای اثر مهاری علیه ژنهای مذکور بود (۲۵).

کارواکرول یکی از مهمترین ترکیبات موثره اسانس مرزه خوزستانی می باشد که توانایی اثر بروی غشاء سیتوپلاسمی، زنجیره انتقال الکترون، فعالیت های متابولیکی، سنتز ژن و مهار سنتز پروتئین را دارد.

با توجه به مقاومت بالای *اسینتوباکتر بومانی* نسبت به فنل، ترکیبات فنلی، داروها، عوامل ضد عفونی کننده و اهمیت این باکتری در عفونت های بیمارستانی و سوختگی ها و همچنین با توجه به اینکه اغلب عوامل بیماری زا در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی می باشد، لذا یافتن یک مکمل درمانی موثر و بی-خطر ضروری می باشد. بنابراین شناسایی ترکیب موثری که بتواند ژنهای بیماریزای این باکتری را مهار نماید اهمیت به سزایی دارد.

References

1. Irfan S, Turton JF, Mehraj J, Siddiqui SZ, Haider S, Zafar A, et al. Molecular and epidemiological characterisation of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from public and private sector intensive care units in Karachi, Pakistan. *J Hosp Infect.* 2011;78(2):143-8.
2. Jawetz E; Adelberg E.A: Medical microbiology 24th ed. Appleton & Long. 2007; p. 266-267.
3. Singh H, Thangaraj P, Chakrabarti A. *Acinetobacter baumannii*: A Brief Account of Mechanisms of Multidrug Resistance and Current and Future Therapeutic Management. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(11):2602-5.
4. Tega L, Raieta K, Ottaviani D, Russo GL, Blanco G, Carraturo A. Catheter-related bacteremia and multidrug-resistant *Acinetobacter lwoffii*. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(2):355-6.

5. Yu WL, Chuang YC, Walther-Rasmussen J. Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control. *J Microbiol Immunol Infect.* 2006;39(4):264-77.
6. Rawat D, Nair D. Extended-spectrum beta-lactamases in Gram Negative Bacteria. *J Glob Infect Dis.* 2010;2(3):263-74.
7. Sharma M, Yadav S, Chaudhary U. Acinetobacter spp as emerging pathogen in neonatal septicemia. *Indian J Pediatr.* 2009;76(8):861.
8. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. ASM Press: Washington,D.C; 1999, pp 539-5.
9. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwartz D, Tarabeia J, Fefer I, Schwaber MJ, et al. Surveillance Cultures and Duration of Carriage of Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii. *Journal of Clinical Microbiology.* 2007;45(5):1551-5.
10. Gerner-Smidt P. Acinetobacter: epidemiological and taxonomic aspects. *Apmis*1994; 102 (Suppl 47) : 1-42.
11. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol.* 2004;94(3):223-53.
12. Chan JZ, Halachev MR, Loman NJ, Constantinidou C, Pallen MJ. Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus Acinetobacter. *BMC Microbiol.* 2012;12(1):302.
13. Brossard KA, Campagnari AA. The Acinetobacter baumannii biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infect Immun.* 2012;80(1):228-33.
14. Jaimand K, Rezaee MB. Investigation extraction by two different apparatus and effects of essential oils on content and constituents of *Tripleurospermum disciforme* (C.A.Mey) Schultz-Bip. *Pajouhesh & Sazandegi.* 2003; 16(3): 2-7.
15. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. January 2012. vol.32 no.3.
16. Zargari A, *Medicinal Plants*. 4th ed. Tehran University Publications, Tehran, 1990; pp.42-45. (In Persian)
17. Michael W. Pfaffl. Quantification strategies in real-time PCR. *International University Line* 2013; Chapter 3 pages 87 - 112.
18. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(9) :826-36.
19. Landman D, Quale JM, Mayoragea D, et al. Citywide clonal outbreak of multiresistant Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned. *Arch Intern Med* 2002, 162: 1515-1520.
20. Komp Lindgren P, Karlsson A, Hughes D. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in Escherichia coli isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(10):3222-32.
21. Nasrolahei M, Zahedi B, Bahador A, Saghi H, Kholdi S, Jalalvand N, et al. Distribution of bla OXA-23 , IS Aba , Aminoglycosides resistant genes among burned & ICU patients in Tehran and Sari, Iran. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2014;13(1):38.
22. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(9):e36.
23. Yin QH, Yan FX, Zu XY, Wu YH, Wu XP, Liao MC, et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology.* 2012;64(1):43-51.
24. Kim E, Choi Y, Jang J, Park T. Carvacrol Protects against Hepatic Steatosis in Mice Fed a High-Fat Diet by Enhancing SIRT1-AMPK Signaling. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013: 290104.
25. Esmaeili D, Mobarez AM, Tohidpour A. Anti-helicobacter pylori activities of shoya powder and essential oils of thymus vulgaris and eucalyptus globulus. *Open Microbiol J.* 2012;6:65-9.
26. Nasrolahei M, Zahedi B, Bahador A, Saghi H, Kholdi S, Jalalvand N, Esmaeili D. Distribution of bla OXA-23 , IS Aba , Aminoglycosides resistant genes among burned & ICU patients in Tehran and Sari, Iran. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 2014 25; 13(1):38