

## بررسی ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه گل بی مرگ (*Helichrysum artemisioides*)، تاثیر آن بر روی تشکیل بیوفیلیم و بیان ژن icaD در جدایه‌های بالینی مقاوم به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس

امیر میرزایی<sup>۱\*</sup>، حسن نوربازرگان<sup>۲</sup>، سید حمیدرضا خاتمی<sup>۳</sup>، سیدعطاءاله سادات شانديز<sup>۴</sup>، آرين رحيمي<sup>۵</sup>، علي اصغر باقري کشتلي<sup>۱</sup>

(۱) گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

(۲) گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

(۳) پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

(۴) گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

(۵) باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۵

### چکیده

**مقدمه:** استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی بوده و به دلیل تشکیل بیوفیلیم طیف وسیعی از بیماری‌ها را ایجاد می‌کند. این مطالعه با هدف بررسی ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه گل بی‌مرگ، اثرات ضدبیوفیلیمی آن بر روی جدایه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و آنالیز بیان ژن icaD انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره گیاه گل بی‌مرگ با استفاده از روش GC/MS مورد مطالعه قرار گرفت. سپس توانایی تشکیل بیوفیلیم در ۵۰ جدایه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش‌های کونگورد آگار و واکنش زنجیره ای پلی مرازی (PCR)، ارزیابی شد. در نهایت پس از تیمار سویه‌ها با غلظت زیر مهارکنندگی عصاره (SubMIC) در مدت زمان ۲۴ ساعت، میزان بیان ژن icaD با روش Real Time PCR ارزیابی شد.

**یافته‌های پژوهش:** آنالیز فیتوشیمیایی عصاره، تعداد ۵۲ ترکیب را نشان داد که بیشترین میزان مربوط به  $\alpha$ -Pinene (۱۲/۵٪) و Carvacrol (۸/۶٪) بود. نتایج بررسی بیوفیلیم نشان داد که از میان ۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس، ۱۰ سویه (۲۰٪) بیوفیلیم مثبت بودند. هم چنین، سنجش کمی بیان ژن icaD در سویه‌های منتخب تحت تاثیر غلظت SubMIC عصاره نشان داد که بیان ژن icaD به میزان معناداری کاهش می‌یابد ( $P < 0.05$ ).

**بحث و نتیجه‌گیری:** با توجه به اثرات چشمگیر عصاره گیاه گل بی‌مرگ بر روی تشکیل بیوفیلیم، به نظر می‌رسد که بتوان از این عصاره به عنوان یک درمان مکمل جهت مهار بیوفیلیم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس استفاده نمود.

**واژه‌های کلیدی:** گل بی مرگ، استافیلوکوکوس اورئوس، بیوفیلیم، icaD

\* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

Email: A.mirzaie@riau.ac.ir

Copyright © 2017 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

## مقدمه

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل بیماری زای فرصت طلب بیمارستانی است که طیف وسیعی از بیماری‌ها از قبیل اندوکاردیت و مننژیت را بوجود می‌آورد (۲،۱). اخیراً مقاومت آنتی بیوتیکی به خصوص مقاومت به متی سیلین در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس شیوع یافته است که باعث پیدایش سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) شده است. مقاومت به متی سیلین به دلیل وجود ژن *mecA* است. ژن *mecA*، پروتئین متصل شونده به پنی سیلین با نام PBP2a را کد می‌کند که میل پیوندی پایینی برای آنتی بیوتیک‌های بتا لاکتام دارد. هم چنین، یکی دیگر از دلایل مقاومت سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیوتیک‌ها تشکیل بیوفیلیم می‌باشد که به یک معطل شدید در عفونت‌های بیمارستانی تبدیل شده است (۳،۲). بیوفیلیم‌ها اجتماعات منسجم میکروبی می‌باشند که درون ماتریکسی از پلیمرهای خارج سلولی محصور شده و روی سطوح جان دار و یا بی جان تشکیل می‌شوند. بیوفیلیم‌ها روی سیستم‌های تهویه هوا، مخازن نفتی و هم چنین بر روی تجهیزات پزشکی مانند کاتترها و اعضای مصنوعی نیز ممکن است مشکلات زیادی را ایجاد کنند. علاوه بر این، بیوفیلیم‌ها میزان مقاومت باکتری‌ها را نسبت به آنتی بیوتیک‌ها افزایش می‌دهند. بطور کلی، تولید بیوفیلیم ناشی از فعالیت اپران *icaADBC* است که مسئول سنتز بخش عمده‌ای از ماتریکس اگزوپلی ساکاریدی (بیوفیلیم) می‌باشد که ژن‌های *icaA* و *icaD* (N-استیل گلوکزآمین ترانسفراز)، *PIA* داستیلاز (*icaB*) و *PIA exporter (icaC)* را کد می‌کنند (۷-۴). در سال‌های اخیر، گسترش مقاومت‌های میکروبی از یک سو و اثرات مضر مصرف آنتی بیوتیک‌ها از سوی دیگر باعث شده است که محققان به منظور دستیابی به ترکیبات ضد میکروبی جدید، از ترکیبات طبیعی مانند عصاره گیاهان دارویی استفاده کنند. هزینه پایین تولید و عدم بروز مشکلات زیست محیطی از جمله مزایایی هستند که گیاهان دارویی را به عنوان یکی از کاندیدای

مناسب برای مهار سویه‌های باکتریایی نموده است (۹). ۸). گیاه گل بی مرگ یا *Helichrysum artemisiodes* از گیاهان بومی کشور ایران واقع در استان مرکزی و از خانواده آستراسه می‌باشد. این گیاه علفی چندساله و با ارتفاع ۱۵-۴۰ سانتی متر می‌باشد و در ماه‌های خرداد تا مرداد به گل دهی می‌رسد (۱۰). این گیاه منبع با ارزشی از ترکیبات ثانویه می‌باشد و از کاربردهای این گیاه می‌توان جهت درمان سنگ کلیه، اختلالات ادراری، دل درد، یرقان، اسهال و تنگی نفس اشاره کرد (۱۱). مطالعات مختلفی خواص ضد بیوفیلیمی گونه‌های مختلف گیاهی را مورد مطالعه قرار داده‌اند. برای مثال محسنی پور و همکارانش در سال ۲۰۱۵، خواص ضد بیوفیلیمی عصاره گیاه *Thymus vulgaris* را بروی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را نشان دادند (۱۲). هم چنین Choi و همکارانش در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که عصاره گیاه *Artemisia princeps* بیان ژن بیوفیلیم را در سویه‌های MRSA استافیلوکوکوس اورئوس کاهش می‌دهد (۱۳).

در حال حاضر، اطلاعات کمی در مورد ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه گل بی مرگ، اثرات ضد بیوفیلیمی آن وجود دارد. بنابراین هدف از این مطالعه، شناسایی ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه گل بی مرگ و بررسی تاثیر آن روی تشکیل بیوفیلیم و بیان ژن *icaD* در سویه‌های بالینی مقاوم به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس بود.

## مواد و روش‌ها

**جمع آوری گیاه و عصاره گیری:** این مطالعه تجربی از فروردین تا شهریور ماه ۱۳۹۴ با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق انجام گرفت. ابتدا گیاه گل بی مرگ از مرکز ذخایر زیستی ایران با شماره هرباریومی P1006608 تهیه شد. مواد گیاهی جمع آوری شده پس از تمیز شدن، در سایه خشک شده و توسط آسیاب پودر گردید و در شرایط بهینه و مناسب نگه داری شد. برای تهیه عصاره اتانولی، میزان ۴۰ گرم از گیاه به ۱۰۰ میلی لیتر از اتانول اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد.

عصاره بدست آمده توسط کاغذ صافی فیلتر شده و وارد دستگاه روتاری شد.

### شناسایی ترکیبات گیاهی با استفاده از دستگاه GC/MS

آنالیز گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی (GC-MS) عصاره گیاه گل بی مرگ با دستگاه Agilent 6890 (ساخت کشور آمریکا) انجام گرفت. نوع ستون DB-5، طول ستون ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر بود و برای ردیابی از سامانه پونیزاسیون الکترونی با انرژی ۷۰ eV استفاده شد. برنامه ریزی حرارتی ستون از ۵۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی گراد با سرعت افزایش دمای ۶ درجه سانتی گراد در دقیقه انجام گرفت. گاز حامل هلیوم ۹۹/۹۹ درصد و مقدار تزریق ۱ میکرولیتر و سرعت جریان گاز ۱۵ میلی لیتر در دقیقه تنظیم شده بود. حجم ۱ میکرولیتر از عصاره گیاه به دستگاه GC/MS تزریق شد و سپس نتایج بدست آمده از دستگاه بر اساس اندیس کوآتس و مراجعه به فرهنگ طبیعی ترکیبات طبیعی مورد شناسایی قرار گرفت.

تفسیر طیف های GC-MS با استفاده از دیتابیس های National Institute Standard and Technology (NIST) که بیش از ۶۲۰۰۰ الگو دارد، انجام شد. طیف های جرمی ناشناخته با طیف های شناخته شده موجود در کتابخانه NIST مقایسه شد. نام، وزن مولکولی و ساختار ترکیب مواد جداسازی شده تایید شد.

### نمونه گیری، کشت و تشخیص جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس

در این مطالعه توصیفی، در مجموع تعداد ۲۵۰ نمونه بالینی طی ۶ ماه در حواصل سالهای ۱۳۹۳-۱۳۹۴ از بیمارستان های مختلف شهر تهران جمع آوری گردید. جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از آزمایش های کاتالاز، رنگ آمیزی گرم، تخمیر مانیتول و DNase تشخیص قطعی داده شدند.

### بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه های جداسازی شده

پس از شناسایی و تایید سویه های استافیلوکوکوس اورئوس، حساسیت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های

مختلف با روش انتشار دیسک (Disk diffusion) بر اساس استاندارد (CLSI) (Clinical and Laboratory Standards Institute) مورد مطالعه قرار گرفت (۱۴). حساسیت جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به دیسک های آنتی بیوتیکی سفوکسیتین (۱۰ میکروگرم)، ونکوماکسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، پنی سیلین (۱۰ واحد)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، تری متوپریم (۲۵ میکروگرم)، آمیکاسین (۱۵ میکروگرم)، آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، آموکسی سیلین (۱۰ میکروگرم)، کلرامفنیکول (۳۰ میکروگرم) و کلیندامایسین (۲ میکروگرم) (MAST, UK) در محیط کشت Muller Hinton agar (مرک، آلمان) انجام گرفت. لازم به ذکر است که جهت تشخیص مقاومت به متی سیلین (MRSA)، از دیسک آنتی بیوتیکی سفوکسیتین استفاده شد. لازم به ذکر است در تمام انجام آزمایش ها، سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 35556 به عنوان کنترل مثبت و از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس ATCC 12228 به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

### تست فنوتیپی تشخیص بیوفیلم

روش مورد استفاده در تست فنوتیپی تشخیص بیوفیلم، روش Freeman و همکاران بود. در این روش از محیط کشت کونگو رد آگار استفاده شد. این محیط کشت حاوی محیط BHI (37 g/L)، سوکروز (50g/L)، آگار (10g/L) و رنگ کونگو رد (0.8 g/L) می باشد. سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس در پلیت حاوی محیط کشت کنگورد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. تحت چنین شرایطی باکتری های تولید کننده بیوفیلم کلنی های مشکی رنگ و سایر باکتری ها کلنی های قرمز رنگ تشکیل می دهند (۱۵).

### استخراج DNA

استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم انجام شد. بطور خلاصه، به رسوب تهیه شده از کشت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس، به ترتیب ۶۰۰ میکرولیتر بافر

لیز (Tris-HCl, pH7.4; EDTA 50mM)، ۱۳ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات (SDS 25%)، ۳ میکرولیتر پروتئیناز K (20mg/ml) اضافه نموده و آن را در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. به دنبال آن ۶۰۰ میکرولیتر محلول فنل-کلروفرم - ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵ تهیه شده) افزوده شده تا یک فاز شیری رنگ یکنواخت تشکیل شود. سپس با دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و فاز بالایی (فاز آبی) را به لوله های جدید منتقل شدند. این مرحله دوبار تکرار شده و به منظور رسوب DNA، هم حجم فاز آبی اتانول سرد و خالص به همراه ۰/۱ میکرولیتر استات سدیم (1M) اضافه نموده و آن به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از آن، لوله مورد را سانتریفیوژ (۵ دقیقه ۱۳۰۰۰ دور) نموده و رسوب حاصله را پس از خشک کردن و حل کردن در بافر به عنوان DNA مورد استفاده قرار داده شد و در نهایت برای تأیید صحت استخراج ژنوم از الکتروفورز ژل آگاروز ۱٪ استفاده شد (۱۶).

### شناسایی ژن های *mecA* و *icaD* توسط روش PCR

واکنش PCR برای ژن *mecA* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده به عنوان الگو، استخراج شده، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر جلوبر، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر برگشتی (۱۰ پیکومول)، ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس (سیناژن، ایران)، ۱۰/۵ میکرولیتر آب از مقطر دو بار تقطیر انجام گرفت. در ادامه واکنش PCR برای ژن *mecA* با استفاده از پرایمرهای جلوبر 3' TCCAGATTACAACCTTCACCAGG و برگشتی 5' CCACCTTCATATCTTGTAACG با چرخه دمایی واسرشتگی اولیه (Initial denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و واسرشتگی (Denaturation) در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو (Annealing) در دمای ۶۰ درجه به مدت ۵۰ ثانیه، طولیل شدن رشته الگو (Extension) در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵۰ ثانیه و طولیل شدن نهایی (Final extension) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گرفت (۱۷). جهت تکثیر ژن *icaD* (ژن بیوفیلیم) از پرایمر *icaD-F* و پرایمر *icaD-R* و برنامه دمایی چرخه های PCR که در جدول ۱ و ۲ آمده است استفاده شد (۱۸).

جدول ۱. مشخصات پرایمر مورد استفاده برای ژن *icaD*.

| ژن هدف      | سایز آمپلیکون | توالی پرایمر (5' to 3')                                          |
|-------------|---------------|------------------------------------------------------------------|
| <i>icaD</i> | ۳۸۱           | F 5'-AAA CGT AAG AGA GGT GG-3'<br>R 5'-GGC AATATG ATC AAG ATA-3' |

جدول ۲. برنامه زمانی ترموسایکلر برای ژن *icaD*.

| زمان (دقیقه) | دما (درجه سانتی گراد) | مراحل             |
|--------------|-----------------------|-------------------|
| ۱۰           | ۹۴                    | واسرشت سازی اولیه |
| ۱            | ۹۴                    | واسرشت سازی       |
| ۱            | ۴۹                    | اتصال             |
| ۱            | ۷۲                    | طولیل سازی        |
| ۷            | ۷۲                    | طولیل سازی نهایی  |

دستورالعمل CLSI به روش رقیق سازی در میکروپلیت و به صورت ۳ بار تکرار انجام گرفت، بدین صورت که عصاره در غلظت های ۶۲/۵ تا ۴۰۰۰ µg/ml به داخل چاهک ها ریخته و با محیط کشت مولر هیتون برات

تعیین حداقل غلظت مهارى (MIC) عصاره به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره گیاه گل بی مرگ از روش MIC (Minimum Inhibitory Concentration) استفاده شد. آزمایش MIC بر اساس

نانومتر توسط دستگاه (Stat Fax) ELISA Reader ، امریکا) خوانده شد (۲۵).

### استخراج RNA، سنتز cDNA و آنالیز بیان ژن

#### icaD توسط روش Real Time PCR

جهت استخراج RNA، سویه های بیوفیلیم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت مولر هینتون براث در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در مجاورت غلظت sub MIC از عصاره گیاه کشت داده شدند. به دنبال آن، استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA (کیاژن، امریکا) بر طبق دستورالعمل انجام گرفت. در ادامه، سنتز cDNA با استفاده از کیت Quanti Tect Reverse Transcription kit (کیاژن، امریکا) انجام گرفت. در انتها، غلظت cDNA های استخراج توسط نانودراپ تعیین غلظت شدند. به منظور بررسی ارزیابی بیان ژن بیوفیلیم (icaD) از روش Real Time PCR کمی (qRT-PCR) با استفاده مستر میکس حاوی سایبرگرین (Applied Biosystem، انگلستان) انجام گرفت. مواد مورد استفاده در حجم ۲۰ میکرولیتر مستر میکس شامل ۲ میکرولیتر از cDNA، ۱۰ پیکومول از پرایمرهای جلوبر و برگشتی، ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس حاوی سایبر گرین بود که در دستگاه Bioneer کره انجام گرفت. برنامه دمایی مورد استفاده در qPCR شامل ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی گراد ۱۵ ثانیه، ۱ دقیقه دمای ۶۰ درجه سانتی گراد بود که در ۴۰ سیکل انجام شد. هم چنین ژن gmk (گوانیلات کیناز) به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. در انتها، بیان نسبی ژن icaD توسط روش  $\Delta\Delta CT$  محاسبه گردید (۲۹). لازم به ذکر است پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۳ نشان داده شده اند.

(MHB) تا حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده می شوند. به همه چاهک ها با مقدار ۵۰ میکرولیتر از کشت میکروبی سویه های تشکیل دهنده بیوفیلیم با غلظت نیم مک فارلند اضافه شد. مقدار MIC به عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد باکتری محسوب می شود (۱۳).

### بررسی فوتوتیپی اثرات ضدبیوفیلیمی عصاره گیاه گل بی مرگ

به منظور مطالعه کمی اثرات ضدبیوفیلیمی عصاره گیاه از روش میکروتیترپلیت استفاده شد. بدین منظور یک کشت ۲۴ ساعته از هر جدایه تهیه کرده و کدورت آن در حدود ۰/۵ مک فارلند رسانده شد (جذب نوری حدود ۰/۰۸ تا ۰/۱ در طول موج ۶۲۵ نانومتر). سپس از این سوسپانسیون در هر یک از چاهک های ۱۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی اضافه شده و به دنبال آن ۵۰ میکرولیتر از غلظت های SubMIC عصاره به آن اضافه کرده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه می شوند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، محلول رویی چاهک ها را خارج شده و هر چاهک ۳ مرتبه با سرم فیزیولوژی شسته می شود. سپس باکتری های متصل به دیواره با ۲۵۰ میکرولیتر از اتانل ۹۶٪ تثبیت می شوند. بعد از ۱۵ دقیقه محتویات چاهک خالی شده و بعد از خشک شدن پلیت ها به آن ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله اضافه می شود (به مدت ۱۵ دقیقه). بعد از گذشت این مدت زمان، رنگ های اضافی از طریق قرار دادن پلیت ها در مسیر آب شهری شسته شدند. بعد از خشک کردن پلیت ها، سنجش کمی بیوفیلیم بوسیله اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳٪ به هر چاهک صورت گرفت و جذب آن در طول موج ۴۹۲

جدول ۳. پرایمرهای مورد استفاده در qPCR.

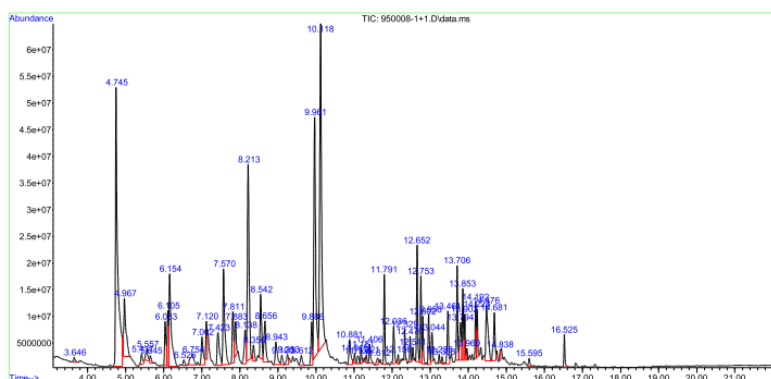
| پرایمر | توالی (5-3)             | محصول اندازه (bp) |
|--------|-------------------------|-------------------|
| icaD-F | ATGGTCAAGCCCAGACAGAG    | 188               |
| icaD-R | CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA | 188               |
| Gmk-F  | TATCAGGACCATCTGGAGTAGG  | 122               |
| Gmk-R  | CATCAACTTCACCTTCACGC    | 122               |

## تجزیه و تحلیل آماری

محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام گردید و نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) مورد بررسی و مرز معناداری روی  $P < 0.05$  قرار گرفت.

## یافته های پژوهش

آنالیز کروماتوگرام GC-MS عصاره گیاه ۵۲ پیک را نشان داد که نشان دهنده وجود ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در گیاه می باشد (شکل ۱). با مقایسه طیف ها با اطلاعات کتابخانه NIST، ۵۲ ترکیب شیمیایی شناسایی شد. از میان ترکیبات شناسایی شده  $\alpha$ -Pinene (۱۲/۵٪) و Carvacrol (۸/۶٪) دارای بیشترین درصد مواد تشکیل دهنده بودند.



شکل ۱. کروماتوگرام بدست آمده از عصاره گل بی مرگ تحت آنالیز GC/MS. آنالیز کروماتوگرام ۵۲ پیک را نشان می دهد که نشان دهنده ۵۲ ترکیب مختلف در عصاره گیاه می باشد.

مقاوم بودند و به عنوان سویه های MRSA در نظر گرفته شدند. در این مطالعه ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که تعداد ۱۰ سویه (۲۰٪) نسبت به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. نتایج آنتی بیوگرام سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از نمونه های بالینی در جدول ۴ خلاصه شده است.

در این مطالعه در مجموع ۲۵۰ نمونه از آزمایشگاه ها و بیمارستان های شهر تهران طی سال های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ جمع آوری شد. نمونه ها از ادرار، خون، پوست و زخم جداسازی شدند. با استفاده از تست های میکروبی رنگ آمیزی گرم، محیط مانیتول سالت آگار، محیط بردپارکر، تست کاتالاز، تست کواگولاز، ۵۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شد. نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که ۳۴ جدایه از ۵۰ جدایه مورد بررسی (۶۸٪) نسبت به آنتی بیوتیک متی سیلین

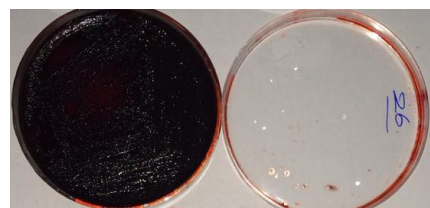
جدول ۴. میزان مقاومت و حساسیت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیوتیک های مختلف.

| آنتی بیوتیک           | مقاوم |      | متوسط |      | حساس  |      |
|-----------------------|-------|------|-------|------|-------|------|
|                       | تعداد | درصد | تعداد | درصد | تعداد | درصد |
| متی سیلین (سفوکسیتین) | ۳۴    | ۶۸   | ۰     | ۰    | ۱۶    | ۳۲   |
| ونکومايسين            | ۰     | ۰    | ۰     | ۰    | ۵۰    | ۱۰۰  |
| سيپروفلوکساسين        | ۱۰    | ۲۰   | ۱     | ۲    | ۳۹    | ۷۸   |
| پنی سیلین             | ۴۹    | ۹۸   | ۰     | ۰    | ۱     | ۲    |
| اریترومايسين          | ۲۸    | ۵۶   | ۹     | ۱۸   | ۱۳    | ۲۶   |

|              |    |    |   |    |     |     |
|--------------|----|----|---|----|-----|-----|
| تری متوپریم  | ۴۳ | ۸۶ | ۳ | ۶  | ۴   | ۸   |
| آمیکاسین     | ۲۱ | ۴۲ | ۳ | ۶  | ۴   | ۸   |
| آمپی سیلین   | ۴۵ | ۹۰ | ۰ | ۰  | ۵   | ۱۰  |
| جنتامایسین   | ۲۰ | ۴۰ | ۳ | ۶  | ۲۷  | ۵۴  |
| آموکسی سیلین | ۴۳ | ۸۶ | ۰ | ۰  | ۷   | ۱۴  |
| کلرامفنیکل   | ۴  | ۸  | ۷ | ۱۴ | ۳۹  | ۷۸  |
| کلیندامایسین | ۲۳ | ۴۶ | ۶ | ۱۲ | ۲۱  | ۴۲  |
| کلیستین      | ۰  | ۰  | ۰ | ۰  | ۱۰۰ | ۱۰۰ |

۱۰ سویه (۲۰ درصد) از نظر تست فنوتیپی بیوفیلم مثبت بودند که تمامی سویه های بیوفیلم مثبت، مقاوم به متی سیلین بودند که ارتباط معناداری بین سویه های تشکیل دهنده بیوفیلم و مقاومت به متی سیلین وجود داشت ( $P<0.001$ ).

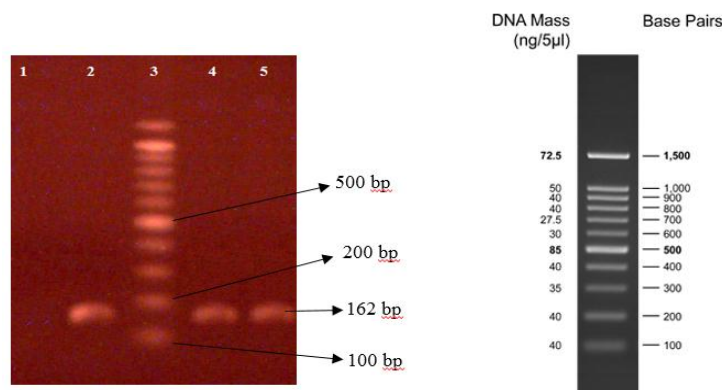
در این مطالعه، از محیط کشت کنگورد آگار برای بررسی فنوتیپی بیوفیلم استفاده شد. باکتری های بیوفیلم مثبت کلنی های مشکی رنگ تولید می کنند در صورتی که باکتری های فاقد بیوفیلم به همان حالت اولیه یعنی قرمز رنگ باقی می ماند (شکل ۲). از میان ۵۰ سویه بالینی،



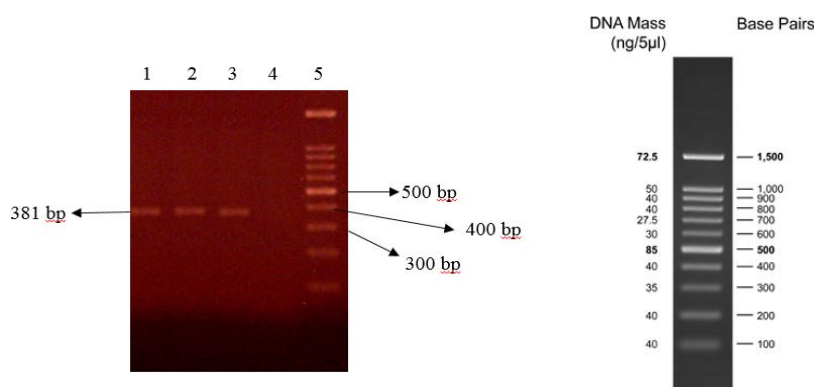
شکل ۲. تصویری از تست کونگورد آگار. همانطور که مشاهده می شود باکتری های تشکیل دهنده بیوفیلم باعث تغییر رنگ قرمز به مشکی می شود.

پرایمرهای اختصاصی این ژن استفاده شد و انتظار وجود باند ۳۸۱ جفت باز وجود داشت که شکل آن در ژل الکتروفورز مشاهده شد (شکل ۴). ژن *icaD* در تمامی سویه هایی که از نظر فنوتیپی بیوفیلم مثبت بودند، دیده شد (۱۰ نمونه). لازم به ذکر است که ارتباط معناداری بین وجود ژن *icaD* و ژن *mecA* در بین سویه ها وجود داشت ( $P<0.05$ ).

برای بررسی مولکولی وجود ژن مقاومت به متی سیلین از تکثیر ژن *mecA* استفاده شد و با توجه به طراحی پرایمرها انتظار باند ۱۶۲ جفت باز وجود داشت (شکل ۳). نتایج نشان داد که توزیع ژن *mecA* در نمونه های استافیلوکوک در ۶۸ درصد نمونه ها (۳۴ نمونه) وجود داشت. به منظور بررسی وجود ژن بیوفیلم (*icaD*) در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده، از



شکل ۳. نمای الکتروفورز از تکثیر ژن *mecA*. ۱: کنترل منفی، ۲ و ۴: نمونه های مثبت، ۳: مارکر 100 bp plus، ۵: کنترل مثبت.



شکل ۴. الکتروفورز محصول PCR ژن *icaD*. ستون ۱ و ۲: PCR ژن *icaD* نمونه های بالینی، ستون ۳: PCR ژن *icaD* نمونه کنترل مثبت، ستون ۴: کنترل منفی.

توانایی تشکیل بیوفیلم نداشتند که در جدول ۶ نشان داده شده است. همانطور که در جدول مشخص است میزان جذب نوری تمامی سویه ها بعد تیمار با عصاره به میزان زیادی کاهش یافته است که نشان دهنده این است که سلول های باکتریایی توانایی تشکیل بیوفیلم را از دست داده و بنابراین توانایی اتصال به کف میکروپلیت را نداشته و جذب نوری آن ها کاهش یافت.

سویه های بیوفیلم مثبت تحت تاثیر غلظت های  $\mu\text{g/ml}$  ۴۰۰-۶۲/۵ از عصاره گیاه در مدت زمان ۲۴ ساعت قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سویه های مختلف دارای محدوده ای از  $\text{MIC } 1000-125 \mu\text{g/ml}$  بودند (جدول ۵). به منظور مطالعه کمی اثرات ضدبیوفیلمی عصاره گیاه از روش میکروتیتیرپلیت استفاده شد. نتایج این تست نشان داد که تمامی سویه ها در غلظت SubMIC عصاره،

جدول ۵. تعیین MIC عصاره گیاه گل بی مرگ در جدایه های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس.

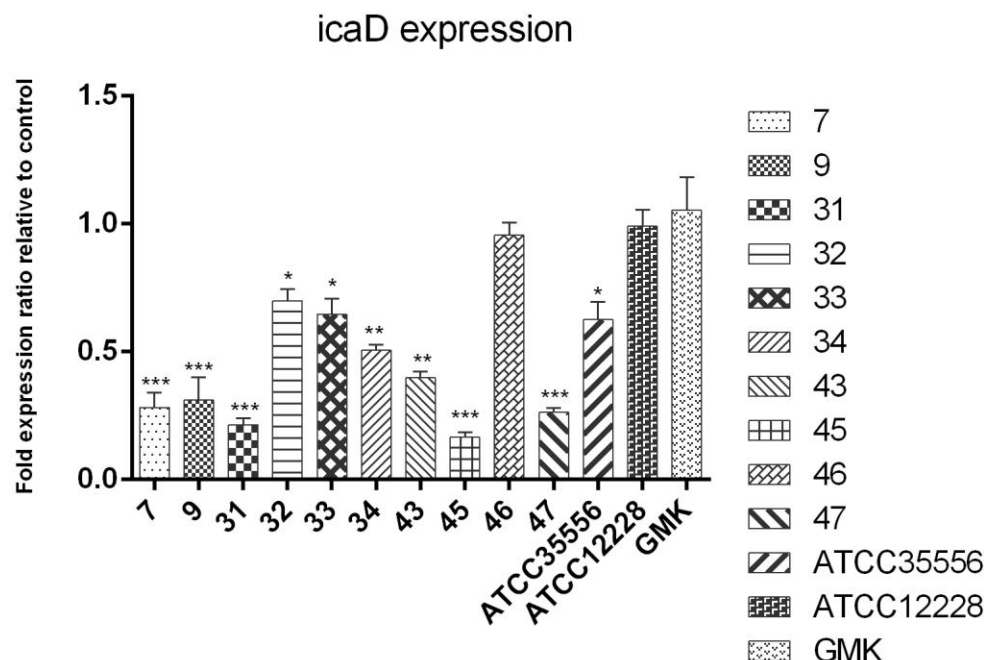
| شماره سویه | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|------------|--------------------------|
| ۷          | ۱۰۰۰                     |
| ۹          | ۵۰۰                      |
| ۳۱         | ۲۵۰                      |
| ۳۲         | ۱۲۵                      |
| ۳۳         | ۲۰۰۰                     |
| ۳۴         | ۵۰۰                      |
| ۴۳         | ۴۰۰۰                     |
| ۴۵         | ۱۰۰۰                     |
| ۴۶         | ۲۵۰                      |
| ۴۷         | ۱۰۰۰                     |
| ATCC 35556 | ۲۰۰۰                     |
| ATCC 12228 | ۵۰۰                      |

جدول ۶. بررسی کمی تولید بیوفیلیم در سویه های تحت تاثیر عصاره گل بی مرگ.

| شماره سویه | جذب نوری در غلظت ۰ از عصاره | عصاره Sub MIC غلظت |
|------------|-----------------------------|--------------------|
| ۷          | ۰/۲۶                        | ۰/۱۳               |
| ۹          | ۰/۱۱                        | ۰/۰۸               |
| ۳۱         | ۰/۲۵                        | ۰/۱۸               |
| ۳۲         | ۰/۳۴                        | ۰/۱۷               |
| ۳۳         | ۰/۲۶                        | ۰/۰۹               |
| ۳۴         | ۰/۴۴                        | ۰/۱۵               |
| ۴۳         | ۰/۳۸                        | ۰/۱۹               |
| ۴۵         | ۰/۵۲                        | ۰/۰۸۶              |
| ۴۶         | ۰/۳۰                        | ۰/۰۸۹              |
| ۴۷         | ۰/۵۱                        | ۰/۲۳               |
| ATCC 35556 | ۰/۴۸                        | ۰/۰۸۲              |
| ATCC 12228 | ۰/۱۱                        | ۰/۰۰۲              |

چنین بیان ژن *icaD* در سویه های تیمار شده با غلظت SubMIC عصاره کاهش یافته بود که نسبت به ژن *gmK* رابطه معناداری داشت. نتایج حاصل از بیان ژن *icaD* در سویه های بیوفیلیم مثبت که تحت تیمار با عصاره بودند، در شکل ۵ آمده است.

بیان نسبی بیوفیلیم (*icaD*) در جدایه های بیوفیلیم مثبت توسط روش Real Time PCR مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که سویه های مختلف بیوفیلیم مثبت، بیان متفاوتی از ژن *icaD* دارند و از نظر آماری تفاوت معنا داری در مقایسه با بیان ژن *gmK* داشتند ( $P < 0.05$ ). هم



شکل ۵. نمودار تغییر بیان ژن *icaD* در سویه های تحت تاثیر عصاره. همانطور که مشاهده می شود میزان بیان ژن *icaD* در مقایسه با ژن کنترل (*gmk*) کاهش بیان معناداری را داشته اند. ( $n=3$ :  $P < 0.001$  \*\*\*،  $P < 0.01$  \*\*,  $P < 0.05$  \*).

امروزه بیوفیلیم را به عنوان یکی از دلایل مزمن شدن عفونت های استافیلوکوکوس اورئوس و همچنین افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک ها مطرح شده است (۱۹). در این مطالعه، سطح بالایی از مقاومت به آنتی بیوتیک های پنی سیلین (۹۸ درصد)، آمپی سیلین (۹۰ درصد)، آموکسی سیلین و تری متوپریم (۸۶ درصد)، سفوکسیتین (۶۸ درصد) مشاهده شد که نشان دهنده میزان بالای مقاومت به آنتی بیوتیک می باشد. مطالعات مختلفی در زمینه بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس به انجام رسیده است. حق گو و همکارانش در سال ۲۰۱۲ الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از بیمارستان شهید مدنی تبریز را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان مقاومت به متی سیلین ۳۱ درصد بوده است. با مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات انجام شده می توان نتیجه گرفت که میزان مقاومت به متی سیلین سال به سال در حال افزایش است و یکی از دلایل افزایش مقاومت، مصرف

میزان بیان پایه ژن خانه دار (*gmk* (House keeping) تحت تاثیر عصاره تغییر چشمگیری نداشت ولی میزان *icaD* بعد از تاثیر عصاره افزایش یافته است که نشان دهنده کاهش بیان ژن *icaD* می باشد. باید توجه کرد که در غلظت های MIC مختلف که در جدول ۶ نشان داده شده است، میزان بیان ژن *icaD* در سویه های بیوفیلیم مثبت تحت تاثیر عصاره کاهش یافته است. در سویه استاندارد استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس ATCC ۱۲۲۲۸ که فاقد ژن *icaD* می باشد، نیز این عصاره تاثیر خاصی بر روی بیان ژن خانه دار *gmk* نداشت است ولی در سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 35556 که دارای ژن *icaD* می باشد، عصاره توانسته است در غلظت زیر حد MIC خود بیان این ژن را کاهش دهد که با کاهش بیان ژن در سویه های بالینی جداسازی شده نیز همخوانی دارد.

### بحث و نتیجه گیری

توانایی استافیلوکوکوس اورئوس در تشکیل بیوفیلیم به زنده ماندن باکتری در محیط میزبان کمک می کند.

بی رویه آنتی بیوتیک ها می شود که گاها بدون تجویز پزشک و بصورت خوددرمانی در بیماران انجام می شود (۲۰).

یکی دیگر از اهداف این مطالعه بررسی میزان تشکیل بیوفیلیم در سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک بود. مطالعه روی توانایی اتصال، تشکیل بیوفیلیم و ژن های دخیل در ایجاد بیوفیلیم در جدایه های مختلف بالینی استافیلوکوکوس اورئوس می تواند اطلاعات ارزشمندی در خصوص درک بهتر روند پیچیده تشکیل بیوفیلیم و عفونت های ناشی از این ارگانیسم ها فراهم نماید. در مطالعه حاضر از میان ۵۰ سویه بالینی، ۱۰ سویه (۲۰ درصد) از نظر تست فنوتیپی بیوفیلیم مثبت بودند که تمامی ۱۰ سویه مقاوم به متی سیلین بودند که ارتباط معناداری بین سویه های تشکیل دهنده بیوفیلیم و مقاومت به متی سیلین وجود داشت. گزارش های بسیاری در مورد ارتباط بین روش های فنوتیپی مانند کونگو رد آگار و حضور ژن *icaD* در نمونه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده در نقاط مختلف جهان منتشر شده است. در مطالعه ای که توسط افتخار و همکارانش در سال ۲۰۱۱ روی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین انجام شد، نشان دادند ۷۳ درصد جدایه های مورد بررسی واجد ژن های *icaAB* بودند. در این گزارش حدود ۷۰ درصد جدایه ها واجد ژن های *ica* بودند (۲۱). در مطالعه ای که توسط نامور در سال ۲۰۱۳ روی ۶۰ جدایه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس انجام گرفت، نشان داده شد، تمامی جدایه ها از نظر ژن *icaC* مثبت بودند، با این حال بررسی توانایی ایجاد بیوفیلیم در این جدایه ها بسیار هتروژن به دست آمده بود (۲۲). در زمینه بررسی ترکیبات تشکیل دهنده عصاره گیاهان از جنس *Helichrysum* با استفاده از روش GC/MS مطالعات مختلفی انجام گرفته است، ولی تاکنون در مورد گیاه *H. artemisiodes* مطالعه ای انجام نشده است. در مطالعه حاضر عصاره گیاه گل بی مرگ از نظر ترکیبات شیمیایی با روش GC/MS مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که

از میان کل ترکیبات شناسایی شده،  $\alpha$ -Pinene (۱۲/۵٪) و Carvacrol (۸/۶٪) دارای بیشترین درصد مواد تشکیل دهنده بودند. صبحی و همکارانش در سال ۲۰۰۷، ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه *H. stoechas* را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که بیشترین میزان ترکیبات مربوط به  $\alpha$ -pinen (59%)، limonene (16.7%) و Bisabolol (9.6%) بود (۲۳). آنگونی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه *H. italicum* را با روش GC/MS مورد بررسی قرار دادند. نتایج این بررسی نشان داد که بیشترین ترکیب موجود در اسانس گیاه مربوط به neryl acetate (28.9%) و linalill (14.9%) بود (۲۴). یکی از دلایل اختلاف برخی از ترکیبات مورد مطالعه حاضر و سایرین می تواند مربوط به منطقه جغرافیایی کشت این گیاهان در سراسر دنیا باشد که باعث می شود برخی از ترکیبات در گونه های مختلف متفاوت باشد. یکی دیگر از اهداف مطالعه حاضر، بررسی میزان تاثیر عصاره گیاه گل بی مرگ بر روی تشکیل بیوفیلیم در سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس بود. مطالعه حاضر برای اولین بار تاثیر عصاره گیاه گل بی مرگ را روی تشکیل بیوفیلیم و بیان ژن *icaD* مورد مطالعه قرار داد. نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت های SubMIC از عصاره گیاه می تواند اثر بازدارندگی بر روی تشکیل بیوفیلیم داشته باشد و بیان ژن *icaD* را در سویه های بیوفیلیم مثبت کاهش دهد. مطالعات مختلفی در سرتاسر دنیا بر روی تاثیر عصاره گیاهان مختلف بر روی بیوفیلیم باکتری ها انجام شده است. در مطالعه ناماسیوایان، نتایج نشان داد که عصاره گیاه سنجید مهار کننده تشکیل بیوفیلیم باکتری اشرشیا کلی با غلظت های مختلف است (۲۴). در مطالعه کیم و همکارانش نتایج نشان داد که عصاره زردچوبه مهار کننده تشکیل بیوفیلیم استرپتوکوکوس موتانس است (۲۵). هم چنین نتایج مطالعه حسینی و همکارانش نشان داد که عصاره گیاه بنه تشکیل بیوفیلیم استرپتوکوکوس موتانس را کاهش می دهد (۲۶). بطور کلی گیاهان دارویی منبع غنی از متابولیت های ثانویه هستند که برخی از آن ها

استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که این اسانس دارای خاصیت ضد میکروبی بوده و غلظت‌های SubMIC این عصاره می‌تواند اثر مهارکنندگی بر روی تشکیل بیوفیلم و تغییرات بیان ژن icaD داشته باشد (۲۹). بطور کلی، با مقایسه نتایج مطالعه حاضر و سایر مطالعات به نظر می‌رسد جهت بررسی دقیق تر مکانیسم ضد بیوفیلمی عصاره گیاه گل بی مرگ، فراکشن‌های مختلف عصاره این گیاه گرفته شود و بصورت جداگانه میزان توانایی آن‌ها بر روی مهار تشکیل بیوفیلم بررسی شود.

نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند گامی موثر در درمان موفق عفونت‌های ناشی از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس باشد. با این وجود، افزایش مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف، باید در بیمارستان‌های مختلف به عنوان یک موضوع جدی مورد توجه قرار گیرد تا ضمن درمان به موقع و موثر، از بروز سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک و انتشار آن در بیمارستان و جامعه جلوگیری به عمل آید. هم چنین با توجه به اهمیت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در بخش‌های درمانی و توانایی این باکتری در ایجاد عفونت‌های متعدد، به منظور پیشگیری از تشکیل بیوفیلم توسط این باکتری می‌توان از عصاره این گیاه جهت مکمل‌های درمانی استفاده کرد.

### سپاسگزاری

این مقاله بخشی از پایان نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق انجام شده است. بدین وسیله از کلیه کسانی که در انجام این تحقیق حمایت کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

### References

1. Nayak N, Satpathy G, Prasad S, Thakar A, Chandra M, Nag TC. Clinical implications of microbial biofilms in chronic rhinosinusitis and orbital cellulitis. BMC Ophthalmol 2016; 21: 16:165.

بطور مستقیم در مهار تشکیل بیوفیلم تاثیر گذار هستند. یکی از مکانیسم‌های مهار تشکیل بیوفیلم توسط عصاره گیاه *H. artemisiodes* ممکن است بر همکنش ترکیبات گیاهی مخصوصا ترکیبات دارای ساختار حلقه‌ای مانند Carvacrol،  $\alpha$ -Pinen،  $\beta$ -Cymene و Terpinen (جدول ۵) با سلول باکتری می‌باشد که بیان ژن بیوفیلم را کاهش می‌دهد و معمولا در گروه ترپن‌ها، ترپنوئیدها، فلاوونوئیدها و سس کوئی‌ترپن‌ها قرار می‌گیرند و اینکه احتمالا ترکیبات ترپنوئیدی موجود در عصاره گیاه گل بی مرگ روی ساختمان غشای سلول تاثیر گذاشته و در تنفس سلولی و فرایندهای انتقال یون‌ها را در سلول‌های باکتریایی تداخل ایجاد می‌کنند و به کاهش تولید بیوفیلم کمک می‌کنند. هم چنین ممکن است ترکیبات موثره عصاره این گیاه در فرایندهای موثر بر تشکیل بیوفیلم مانند کوروک سنسینگ اختلال ایجاد نمایند. البته ناگفته نماند مکانیسم تاثیر دقیق عصاره گیاهان بر روی سلول‌های باکتریایی دقیقا مشخص نیست و مطالعات بسیار زیاد و دقیقی برای اثبات این اثرات مورد نیاز می‌باشد. De Carvalho و همکارانش ثابت کردند که ترکیبات طبیعی مانند ترپن‌ها می‌توانند اثر ضد بیوفیلمی داشته باشند به طوری که این ترکیبات ترپنی، ساختار و ترکیب اسیدهای چرب غشایی را تحت تاثیر قرار داده و تشکیل بیوفیلم کاهش می‌یابد (۲۷).

ایبائو ما و همکارانش در سال ۲۰۱۲ آنالوگی از CCG-2979 را در شرایط آزمایشگاهی بطور شیمیایی سنتز کردند و اثر آن را بر روی تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که این ترکیب دارای خاصیت بیوفیلمی بوده و بیان ژن‌های مرتبط با بیوفیلم را کاهش می‌دهد (۲۸). نوریاستوتی و همکارانش در سال ۲۰۰۹ تاثیر اسانس Cinnamon oil را بر روی بیان ژن icaD در نمونه‌های

2. Monecke S, Jatzwauk L, Muller E, Nitschke H, Pfohl K, Slickers P, Reissig A, et al. Diversity of SCCmec elements in *Staphylococcus aureus* as observed in south eastern Germany. PLoS One 2016; 20:162654.

3. Zhu Y, Cleaver L, Wang W, Podoll JD, Walls S, Jolly A, Wang X. Tetracyclic indolines as a novel class of  $\beta$ -lactam-selective resistance modifying agent for MRSA. *Eur J Med Chem* 2016;10: 125:130-42.
4. Son H, Park S, Beuchat LR, Kim H, Ryu JH. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by antimicrobial biofilms formed by competitive exclusion microorganisms on stainless steel. *Int J Food Microbiol* 2016;13:165-71.
5. Rimoldi SG, Devecchi E, Pagani C, Zambelli A, Di Gregorio A, Bosisio E, et al. use of dithiothreitol to dislodge bacteria from the biofilm on an aortic valve in the operating theatre a case of infective endocarditis caused by *Staphylococcus aureus* and *Proteus mirabilis*. *Ann Thorac Surg* 2016;102:357-9.
6. Aslantaş O, Demir C. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases. *J Dairy Sci* 2016; 31:32-9.
7. Steven Y. Tong C, Joshua S, Eichenberger E, Thomas L, Vance G. *Staphylococcus aureus* infections epidemiology pathophysiology clinical manifestations and management. *Clin Microbiol Rev* 2015;28:603-61.
8. Ghilissi Z, Sayari N, Kallel R, Bougatef A, Sahnoun Z. Antioxidant antibacterial anti-inflammatory and wound healing effects of *Artemisia campestris* aqueous extract in Rat. *Biomed Pharmacother* 2016;16:84:115-22.
9. Matijasevic D, Pantic M, Raskovic B, Pavlovic V, Duvnjak D, Sknepnek A, et al. The antibacterial activity of *coriolus versicolor* methanol extract and its effect on ultrastructural changes of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis*. *Front Microbiol* 2016; 4:7:1226.
10. Ferrazzano GF, Roberto L, Catania MR, Chiaviello A, Denatale A, Roscetto E, et al. Screening and scoring of antimicrobial and biological activities of Italian vulnerary plants against major oral pathogenic bacteria. *Evid Base Comple Alte Med* 2013; 2013:316280.
11. Esmaili A. Biological activities and chemical composition of the stems and roots of *Helichrysum oligocephalum* DC grown in Iran. *Pak J Pharm Sci* 2013;26:599-604.
12. Mohsenipour Z, Hassanshahian M. The inhibitory effect of *Thymus vulgaris* extracts on the planktonic form and biofilm structures of six human pathogenic bacteria. *Avic J Phytom* 2015;5:309-18.
13. Choi NY, Kang SY, Kim KJ. *Artemisia princeps* inhibits biofilm formation and virulence factor expression of antibiotic resistant bacteria. *Biomed Res Int* 2015; 2015:239519.
14. Michael GB, Freitag C, Fessler AT, Wendlandt S, Eidam C, Entorf M. Antimicrobial resistance ESBL and MRSA-definitions and laboratory diagnostics. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2014;127:339-48.
15. Barakat GI, Nabil YM. Correlation of mupirocin resistance with biofilm production in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from surgical site infections in a tertiary centre, Egypt. *J Glob Antimicrob Res* 2016; 4:16-20.
16. Panda PS, Chaudhary U, Dube SK. Comparison of four different methods for detection of biofilm formation by uropathogens. *Indian J Pathol Microbiol* 2016;59:177-9.
17. Mobasherizadeh S, Shojaei H, Havaei SA, Mostafavizadeh K, Davoodabadi F, Khorvash F, et al. Nasal carriage screening of community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in healthy children of a developing country. *Adv Biomed Res* 2016;30;5:144.
18. Mirzaee M, Najarpour S, Behmanesh M, Moghadam MF. Relationship between adhesin genes and biofilm formation in vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Curr Microbiol* 2015;70:665-70.
19. Shin K, Yun Y, Yi S, Lee HG, Cho JC, Suh KD, et al. Biofilm forming ability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from human skin. *J Dermatol Sci* 2013; 71:130-7.
20. Haghgoo S, Moaddab S, Rafi A. Study of antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus aureus* strains isolated from blood cultures in Tabriz Shahid Madani hospital. *J Jundishapur* 2012;3:383-90.
21. Eftekhari F, Dadaei T. Biofilm formation and detection of *icaAB* genes in clinical

- isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Iran J Bas Med Sci 2011; 14: 132-136.
- 22.Namvar AE, Asghari B, Ezzatifar F, Azizi G, Lari AR. Detection of the intercellular adhesion gene cluster in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. GMS Hyg Infect Cont2013;29;8:25-31.
- 23.Sobhy E. A, Elfeky SS. Chemical constituents and antimicrobial activity of *Helichrysum stoechas*. Asian J Plant Sci 2007;6:692-99.
24. Angioni A, Barra A, Arlorio M, Coisson JD, Russo MT, Pirisi FM, et al. Chemical composition plant genetic differences and antifungal activity of the essential oil of *Namasivayam* SK Roy EA. J Agric Food Chem2003; 12:1030-4.
- 25.Karthick S, Namsivayam P. Antibiofilm effect of medicinal plant extracts against clinical isolate of biofilm of *Escherichia coli*. Int J Pharm Pharma Sci 2013; 5:486-9.
- 26.Hosseini F, Adlgostar A, Sharifnia F. Antibacterial activity of *pistacia atlantica* extracts on *Streptococcus mutans* biofilm. Int Res J Bio Sci 2013;2:1-7.
- 27.Decarvalho CC, Dafonseca MM. Preventing biofilm formation: promoting cell separation with terpenes. FEMS Microbiol Ecol 2007;61:406-13.
- 28.Ma Y, Xu Y, Yestrepsky BD, Sorenson RJ, Chen M, Larsen SD, et al. Novel inhibitors of *Staphylococcus aureus* virulence gene expression and biofilm formation. PLoS One 2012;7: 47255.
- 29.Nuryastuti T, Vandermei HC, Busscher HJ, Irvati S, Aman AT, Krom BP. Effect of cinnamon oil on *icaA* expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. Appl Environ Microbiol 2009;75:6850-5.



## Evaluation of Chemical Composition of *Helichrysum artemisioides* Extract Its Effect on Biofilm Formation and *icaD* Gene Expression in Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Mirzaie A<sup>1\*</sup>, Noorbazargan H<sup>2</sup>, Khatami H<sup>3</sup>, Sadatshandiz A<sup>4</sup>, Rahimi A<sup>5</sup>, Bagherikashtali A<sup>1</sup>

(Received: October 26, 2016 Accepted: January 14, 2017)

### Abstract

**Introduction:** *Staphylococcus aureus* is a major causative agent of nosocomial infections which produces a wide range of diseases due to biofilm formation. This study aimed to investigate the phytochemical composition of *Helichrysum artemisioides* extract, its anti-biofilm effects on clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, as well as, analysis of *icaD* gene expression.

**Materials & methods:** First, the phytochemical composition of *H. artemisioides* extract was studied by GC/MS method. Then, the biofilm formation capacity of 50 clinical isolates of *S. aureus* was evaluated by Congo red agar and polymerase chain reaction (PCR). Finally, after treatment of strains with SubMIC concentration of the extract within 24 hours, the expression level of *icaD* gene was evaluated by Real Time PCR.

**Findings:** The phytochemical analysis of extract showed 52 compounds, including  $\alpha$ -Pinene (12.5%) and Carvacrol (8.6%) as the major components. The evaluation of biofilm formation test shows that out of 50 strains of *S. aureus*, 10 strains (20%) were positive for biofilms formation. Also, after treatment of selected strains by SubMIC concentration of the extract, the gene expression quantitation of *icaD* was down-regulated significantly ( $P<0.05$ ).

**Discussion & conclusions:** Due to the significant effects of *H. artemisioides* extract on biofilm formation, it seems that the extract could be used as complementary therapy to inhibit *S. aureus* biofilm.

**Keywords:** *Helichrysum artemisioides*, *Staphylococcus aureus*, Biofilm, *icaD*

1. Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

2. Dept of Biotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Dept of Bioscience and Biotechnology, Malek-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

4. Dept of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

5. Young Researchers and Elite Club, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

\* Correspondin author Email: A.mirzaie@riau.ac.ir