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

امیر میرزایی[1*]، حسن نوربازرگان[2]، سید حمیدرضا خاتمی[3]، سیدعطااله سادات شاندیز[4]، آرین رحیمی[5]، علی اصغر باقری کشتلی[1]

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 دریافت: ۹۵/۸/۵ تاریخ پذیرش:۹۵/۱۰/۲۵

چکیده

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

مواد و روش ها: ابتدا ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره گیاه گل بی مرگ با استفاده از روش GC/MS مورد مطالعه قرار گرفت. سپس توانایی تشکیل بیوفیلم 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.

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

بحث و نتیجه گیری: با توجه به اثرات چشمگیر عصاره گیاه گل بی مرگ بر روی تشکیل بیوفیلم، به نظر می رسد که بتوان از این عصاره به عنوان یک درمان مکمل جهت مهار بیوفیلم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس استفاده نمود.

واژه های کلیدی: گل بی مرگ، استافیلوکوکوس اورئوس، بیوفیلم، 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 فرصت‌طلب بیمارستانی است که طیف وسیعی از بیماری‌ها از قبیل اندوکاردیت و مننزیت را بوجود می آورد (۲،۱). اخیرا مقاومت آنتی بیوتیکی به خصوص مقاومت به متی سیلین در سویه‌های استافیلوکوکوس ارئوس 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 PBP2aرا کد می‌کند که میل پیوندی پایینی برای آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام دارد. هم چنین، یکی دیگر از دلایل مقاومت سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیوتیک ها تشکیل بیوفیلم می باشد که به یک معظل شدید در عفونت‌های بیمارستانی تبدیل شده است (۳، ۲). بیوفیلم‌ها اجتماعات منسجم میکروبی می باشند که درون ماتریکسی از پلیمرهای خارج سلولی محصور شده و روی سطوح جان دار و یا بی جان تشکیل می‌شوند. بیوفیلم ها 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، بیوفیلم ها میزان مقاومت باکتری‌ها را نسبت به آنتی بیوتیک‌ها افزایش می دهند. بطور کلی، تولید بیوفیلم ناشی از فعالیت اپران icaADBC است که مسئول سنتز بخش عمده ای از ماتریکس اگزوپلی ساکاریدی (بیوفیلم) می باشد که ژن‌های icaA و icaD (N–استیل گلوکزآمین ترانسفراز)، PIA داستیلاز (icaB) و PIA exporter (icaC) را کد می کنند (۷-۴).

در سال‌های اخیر، گسترش مقاومت‌های میکروبی از یک سو و اثرات مضرر مصرف آنتی بیوتیک‌ها از سوی دیگر باعث شده است که محققان به منظور دستیابی به ترکیبات ضدمیکروبی 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 سویه های 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 می باشد. این گیاه علفی چندساله و با ارتفاع ۱۵-۴۰ سانتی متر می باشد و در ماه های خرداد تا مرداد به گل دهی می رسد (۱۰). این گیاه منبع با ارزشی از ترکیبات ثانویه می باشد و از کاربردهای این گیاه می توان جهت درمان سنگ کلیه، اختلالات ادراری، دل درد، یرقان، اسهال و تنگی نفس اشاره کرد (۱۱). مطالعات مختلفی خواص ضدبیوفیلمی گونه های مختلف گیاهی را مورد مطالعه قرار داده اند. برای مثال محسنی پور و همکارانش در سال ۲۰۱۵، خواص ضدبیوفیلمی 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 بیوفیلم را در سویه-های MRSA استافیلوکوکوس اورئوس کاهش می دهد (۱۳).

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

مواد و روش ها

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 کواتس و مراجعه به فرهنگ طبیعی ترکیبات طبیعی مورد شناسایی قرار گرفت.

تفسیر طیف های GC-MS با استفاده از دیتابیس‌های 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 جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس

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

بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌های جداسازی شده

پس از شناسایی و تایید سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، حساسیت سویه‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف با روش انتشار دیسک (Disk diffusion) بر اساس استاندارد (CLSI) (Clinical and Laboratory Standards Institute) مورد مطالعه قرار گرفت (۱۴). حساسیت جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به دیسک‌های آنتی بیوتیکی سفوکسیتین (۱۰ میکروگرم)، ونکومایسین (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 آزمایش‌ها، 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. سویه‌های 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 کلنی‌های مشکی رنگ و سایر باکتری‌ها 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 سویه‌های 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 rpm۱۳۰۰۰ 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 تائید 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 TCCAGATTACAACTTCACCAGG 3’ 5’ و برگشتی CCACTTCATATCTTGTAACG 3’ 5’ 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، طویل شدن رشته الگو (Extension) در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵۰ ثانیه و طویل شدن نهایی (Final extension) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گرفت (۱۷). جهت تکثیر ژن icaD (ژن بیوفیلم) 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.

سایز آمپلیکون	توالی پرایمر (5′ to 3′)	ژن هدف
۳۸۱	F 5’-AAA CGT AAG AGA GGT GG-3’ R 5’-GGC AATATG ATC AAG ATA-3’	icaD

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	طویل سازی
۷	۷۲	طویل سازی نهایی

تعیین حداقل غلظت مهاری (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 دستورالعمل CLSI به روش رقیق سازی در میکروپلیت و به صورت ۳ بار تکرار انجام گرفت، بدین صورت که عصاره در غلظت های µg/ml ۶۲/۵ تا ۴۰۰۰ به داخل چاهک‌ها ریخته و با محیط کشت مولر هینتون براث

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

بررسی فنوتیپی اثرات ضدبیوفیلمی عصاره گیاه گل بی مرگ

به منظور مطالعه کمی اثرات ضدبیوفیلمی 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 چاهک‌های 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 بیوفیلم بوسیله اضافه کردن ۲۰۰ میکرولبتر اسید استیک ۳۳٪ به هر چاهک صورت گرفت و جذب آن در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه ELISA Reader (Stat Fax ، امریکا) خوانده شد (۲۵).

استخراج RNA، سنتز cDNA و آنالیز بیان ژن icaD توسط روش Real Time PCR

جهت استخراج RNA، سویه های بیوفیلم 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 بیوفیلم (icaD) از روش Real Time PCR کمی (qRT-PCR) با استفاده مسترمیکس حاوی سایبرگرین (Applied Biosystem، انگلستان) انجام گرفت. مواد مورد استفاده در حجم ۲۰ میکرولیتر مسترمیکس شامل ۲ میکرولیتر از cDNA، ۱۰ پیکومول از پرایمرهای جلوبر و برگشتی، ۱۰ میکرولیتر از مسترمیکس 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.

جدول ۳. پرایمرهای مورد استفاده در qPCR.

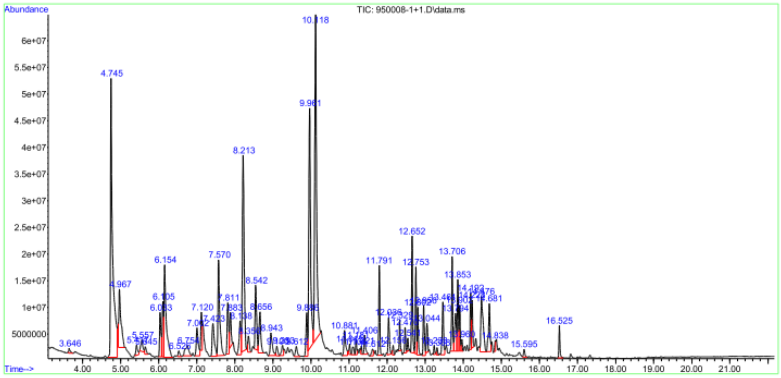
پرایمر	توالی (5-3)	اندازه محصول (bp)
icaD-F	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	188
icaD-R	CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA	188
Gmk-F	TATCAGGACCATCTGGAGTAGG	122
Gmk-R	CATCAACTTCACCTTCACGC	122

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 α-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.

در این مطالعه در مجموع ۲۵۰ نمونه از آزمایشگاه ها و بیمارستان های شهر تهران طی سال های ۱۳۹۴-۱۳۹۳ 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 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 سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از نمونه های بالینی در جدول ۴ خلاصه شده است.

جدول ۴. میزان مقاومت و حساسیت سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیوتیک‌های مختلف.

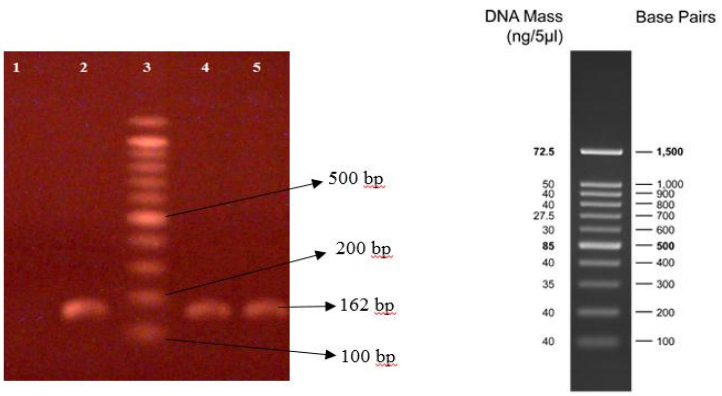
آنتی بیوتیک	مقاوم		متوسط		حساس	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
متی سیلین (سفوکسیتین)	۳۴	۶۸	۰	۰	۱۶	۳۲
ونکومایسین	۰	۰	۰	۰	۵۰	۱۰۰
سیپروفلوکساسین	۱۰	۲۰	۱	۲	۳۹	۷۸
پنی سیلین	۴۹	۹۸	۰	۰	۱	۲
اریترومایسین	۲۸	۵۶	۹	۱۸	۱۳	۲۶

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

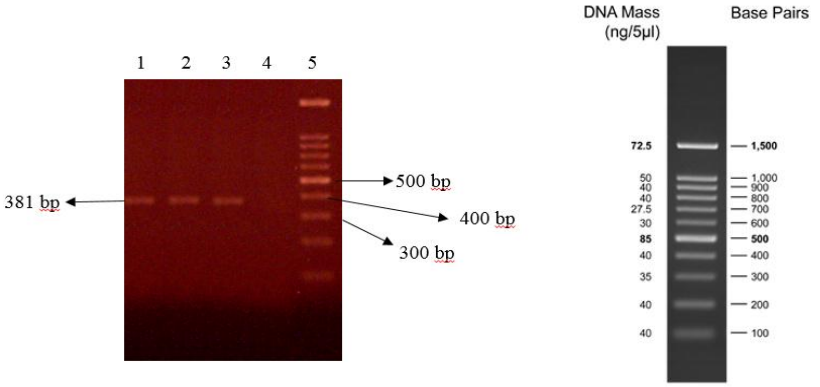
در این مطالعه، از محیط کشت کنگورد آگار برای بررسی فنوتیپی بیوفیلم استفاده شد. باکتری های بیوفیلم مثبت کلنی های مشکی رنگ تولید می‌کنند در صورتی که باکتری‌های فاقد بیوفیلم به همان حالت اولیه یعنی قرمز رنگ باقی می مانند (شکل ۲). از میان ۵۰ سویه بالینی، ۱۰ سویه (۲۰ درصد) از نظر تست فنوتیپی بیوفیلم مثبت بودند 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 ($P<0.001$).

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

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 استافیلوکوکی در ۶۸ درصد نمونه‌ها (۳۴ نمونه) وجود داشت. به منظور بررسی وجود ژن بیوفیلم (icaD) در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده، از 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 ($P<0.05$).



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.

سویه های بیوفیلم مثبت تحت تاثیر غلظت های µg/ml ۶۲/۵–۴۰۰۰ از عصاره گیاه در مدت زمان ۲۴ ساعت قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سویه های مختلف دارای محدوده ای از MIC ۱۲۵ µg/ml–۱۰۰۰ بودند (جدول ۵). به منظور مطالعه کمی اثرات ضدبیوفیلمی عصاره گیاه از روش میکروتیترپلیت استفاده شد. نتایج این تست نشان داد که تمامی سویه‌ها در غلظت SubMIC عصاره، توانایی تشکیل بیوفیلم نداشتند که در جدول ۶ نشان داده شده است. همانطور که در جدول مشخص است میزان جذب نوری تمامی سویه‌ها 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.

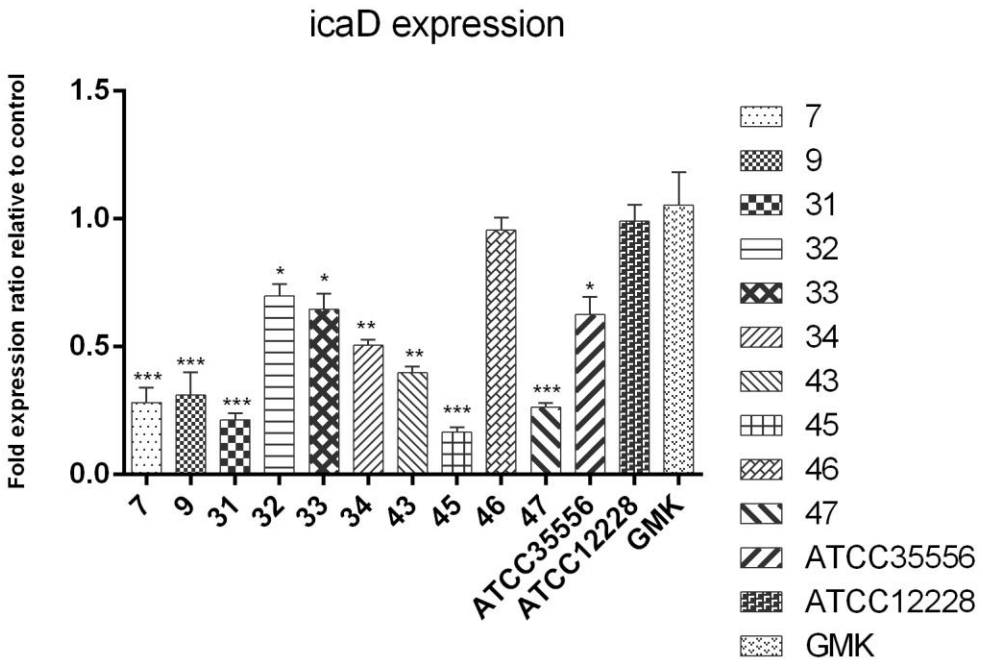
جدول ۵. تعیین MIC عصاره گیاه گل بی مرگ در جدایه های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس.

شماره سویه	MIC (µg/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 بیوفیلم در سویه‌های تحت تاثیر عصاره گل بی مرگ.

شماره سویه	جذب نوری در غلظت ۰ از عصاره	عصارهSub 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

بیان نسبی بیوفیلم (icaD) در جدایه‌های بیوفیلم مثبت توسط روش Real Time PCR مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که سویه های مختلف بیوفیلم 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 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 بیوفیلم مثبت که تحت تیمار با عصاره بودند، در شکل ۵ آمده است.



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. (*: P <۰/۰۵ ، **: P <۰/۰۱ ، *** P <۰/۰۰۱ : n=3).

میزان بیان پایه ژن خانه دار (gmk (House keeping تحت تاثیر عصاره تغییر چشمگیری نداشت ولی میزان ct ژن 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 بیوفیلم مثبت تحت تاثیر عصاره کاهش یافته است. در سویه استاندارد استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس ۱۲۲۲۸ ATCC که فاقد ژن icaD می باشد، نیز این عصاره تاثیر خاصی بر روی بیان ژن خانه دار gmk نداشته 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 بیوفیلم به زنده ماندن باکتری در محیط میزبان کمک می کند. امروزه بیوفیلم را به عنوان یکی از دلایل مزمن شدن عفونت‌های استافیلوکوکوس اورئوس و همچنین افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک ها مطرح شده است (۱۹). در این مطالعه، سطح بالایی از مقاومت به 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

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 بیوفیلم در سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی بیوتیک بود. مطالعه روی توانایی اتصال، تشکیل بیوفیلم و ژن های دخیل در ایجاد بیوفیلم در جدایه های مختلف بالینی استافیلوکوکوس اورئوس می تواند اطلاعات ارزشمندی در خصوص درک بهتر روند پیچیده تشکیل بیوفیلم 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 بیوفیلم مثبت بودند که تمامی ۱۰ سویه مقاوم به متی سیلین بودند که ارتباط معناداری بین سویه های تشکیل دهنده بیوفیلم 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 بیوفیلم 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 مطالعه‌ای 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، α-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 یررسی 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 بیوفیلم در سویه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس بود. مطالعه حاضر برای اولین بار تاثیر عصاره گیاه گل بی مرگ را روی تشکیل بیوفیلم 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 بیوفیلم داشته باشد و بیان ژن icaD را در سویه های بیوفیلم مثبت کاهش دهد. مطالعات مختلفی در سرتاسر دنیا بر روی تاثیر عصاره گیاهان مختلف بر روی بیوفیلم باکتری ها انجام شده است. در مطالعه ناماسیوایان، نتایج نشان داد که عصاره گیاه سنجد مهار کننده تشکیل بیوفیلم باکتری اشرشیا کلی با غلظت های مختلف است (۲۴). در مطالعه کیم و همکارانش نتایج نشان داد که عصاره زردچوبه مهار کننده تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس است (۲۵). هم چنین نتایج مطالعه حسینی و همکارانش نشان داد که عصاره گیاه بنه تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس را کاهش می دهد (۲۶). بطور کلی گیاهان دارویی منبع غنی از متابولیت های ثانویه هستند که برخی از آن ها

بطور مستقیم در مهار تشکیل بیوفیلم تاثیر گذار هستند. یکی از مکانیسم های مهار تشکیل بیوفیلم توسط عصاره گیاه H. artemisiodes ممکن است بر همکنش ترکیبات گیاهی مخصوصا ترکیبات دارای ساختار حلقه ای مانند Carvacrol، α-Pinen، β-Cymene و Terpinen (جدول ۵) با سلول باکتری می باشد که بیان ژن بیوفیلم را کاهش می دهد و معمولا در گروه ترپن‌ها، ترپنوئیدها، فلاوونوئیدها و سس کوئی‌ترپن‌ها قرار می گیرند 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 یون ها را در سلول های باکتریایی تداخل ایجاد می کنند و به کاهش تولید بیوفیلم کمک می کنند. 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 می باشد. De Carvalho و همکارانش ثابت کردند که ترکیبات طبیعی مانند ترپن ها می توانند اثر ضدبیوفیلمی داشته باشند به طوری که این ترکیبات ترپنی، ساختار و ترکیب اسیدهای چرب غشایی را تحت تاثیر قرار داده و تشکیل بیوفیلم کاهش می یابد (۲۷).

ایبائو ما و همکارانش در سال ۲۰۱۲ آنالوگی از CCG-2979 را در شرایط آزمایشگاهی بطور شیمیایی سنتز کردند و اثر آن را بروی تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که این ترکیب دارای خاصیت بیوفیلمی بوده و بیان ژن های مرتبط با بیوفیلم را کاهش می دهد (۲۸). نوریاستوتی و همکارانش در سال ۲۰۰۹ تاثیر اسانس Cinnamon oil را بر روی بیان ژن icaD در نمونه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که این اسانس دارای خاصیت ضدمیکروبی بوده و غلظت‌های SubMIC این عصاره می تواند 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 می رسد جهت بررسی دقیق تر مکانیسم ضدبیوفیلمی عصاره گیاه گل بی مرگ، فراکشن های مختلف عصاره این گیاه گرفته شود و بصورت جداگانه میزان توانایی آن ها بر روی مهار تشکیل بیوفیلم بررسی شود.

نتایج حاصل از این تحقیق می تواند گامی موثر در درمان موفق عفونت های ناشی از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس باشد. با این وجود، افزایش مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف، باید در بیمارستان های مختلف به عنوان یک موضوع جدی مورد توجه قرار گیرد تا ضمن درمان به موقع و موثر، از بروز سویه های 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 بخش های درمانی و توانایی این باکتری در ایجاد عفونت های متعدد، به منظور پیشگیری از تشکیل بیوفیلم توسط این باکتری می توان از عصاره این گیاه جهت مکمل های درمانی استفاده کرد.

سپاسگزاری

این مقاله بخشی از پایان نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد می باشد 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 می گردد.

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.

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 β-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.Ghlissi 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.Esmaeili 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. Avice 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 Microbiol2016;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, Najarpeerayeh 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.Eftekhar 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, Iravati 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[1], Noorbazargan H[2], Khatami H[3], SadatshandizA[4], Rahimi A[5], Bagherikashtali A[1]*

(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 α-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 ($P<0.05$).

Discusion & 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 artemisiodes, Staphylococcus areus, 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*