Short Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 13, Number 3 (July - August)

Journal homepage: www.ijmm.ir

The Effect of *Matricaria chamomilla* Alcoholic Extract on Phenotype Detection of Efflux Pumps of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from Skin Lesions

Pargol Abdi[1], Maasoumeh Mahdavi Ourtakand[2*], Sahar Honarmand Jahromy[1]

1. Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
2. Department of Biology, College of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

Article Information

Article Subject:
Antimicrobial Agents

10.30699/ijmm.13.3.220

Corresponding author:

Maasoumeh Mahdavi Ourtakand
Department of Biology, College of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

Email:
masumehmahdavi@gmail.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains are resistant to many antibiotics. One of the major causes of drug resistance in bacteria is the efflux pumps. Matricaria chamomilla is a plant that is effective in treating skin diseases. The aim of this study was to investigate the effect of M. chamomilla alcoholic extract on phenotype detection and inhibition of efflux pumps of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) isolated from skin lesions.

Materials and Methods: The study was performed on 30 strains of *S. aureus* isolates collected from skin infections.The Strains of MRSA were detected by *cefoxitin disc* diffusion test. *M. chamomilla* alcoholic extract was prepared and its MIC was obtained against MRSA strains by broth microdilution method. Cartwheel method was used to study phenotypic activity of efflux pump. The effect of *M. chamomilla* extract was investigated on strains with active efflux pumps.

Results & Conclusion: from 30 strains of isolated *S. aureus*, 33.3% were methicillin-resistant. Three strains (10%) had active efflux pump, among which one strain was detected as MRSA. MIC of *M. chamomilla* extract was between 128-64 µg/ml. With the effect of ½ MIC of *M. chamomilla* extract on the strains with a strong efflux pumps, the two stains were reported as non-actives. *M. chamomilla* extract on the MRSA strain efflux pump was ineffective. Antimicrobial effect of *M. chamomilla* extract was confirmed on MRSA isolated from skin lesions.

Keywords: *Matricaria chamomilla, Phenotype, MRSA, Antimicrobial Drug Resistance, Antimicrobial Agents.*

Received: 2017/10/23 Accepted: 2019/05/16 Available online: 2019/08/23

Copyright © 2019. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

How to cite this article:

Abdi P, Mahdavi Ourtakand M, Honarmand Jahromy S. The Effect of Matricaria chamomilla Alcoholic Extract on Phenotype Detection of Efflux Pumps of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Isolated from Skin lesions. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (3) :220-231

Download citation:
BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks
Send citation to:
Mendeley Zotero RefWorks

Introduction

Staphylococcus aureus, in particular, methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), is one of the main causes of hospital infections and community-acquired infections, with high morbidity and mortality rates worldwide (1). *S. aureus* infections cause difficult conditions to care and treat ulcers, damaged skin and soft tissue (2). MRSA are the principle cause of colonization and infection in the acute and chronic ulcerous lesions (4). Efflux Pump is one of the mechanisms of these bacteria in order to show antibiotic resistance (5). Many studies have investigated the inhibitory effect of some plant essential oils on efflux pumps in *S. aureus* strains (8-10). The simple way to evaluate the phenotypic effect of the efflux pump is the use of EtBr-Agar, which takes advantage agar plates and contains EtBr-increasing concentrations, which is known as the EtBr-Agar or cartwheel method (11, 12). Inside the plants, some compounds act in association with the antimicrobial agents, as they are responsible for disrupting the function of the efflux pumps in plant pathogens (7). Some plants have been involved in the treatment of skin diseases, and their effects have been proven like *Matricaria chamomilla* belongs to *Asteracae* family. This plant has antimicrobial and anti-inflammatory effects (13,14). The aim of this study was to investigate the effect of *M. chamomilla* alcoholic extract on phenotypes of MRSA strains isolated from skin lesions.

Materials and Methods

This study was performed on 30 samples of *S. aureus* collected from patients with skin lesions who referred to Shariati hospital in Tehran in the spring of 2017. The samples were characterized by different biochemical tests, including Gram stain, catalase, coagulase, DNase and mannitol fermentation, which led to identification and isolation. The antibiotics resistance of strains was assessed by disk diffusion method. To detect the phenotypic resistance of *methicillin-resistant S. aureus*, the susceptibility of the bacterial specimen to Cefoxitin disc (30 µg) in the Muller Hinton Culture medium was investigated. The *M. chamomilla* capitols were collected from Ardebil city and after taxonomic identification, they dried at 25°C in the shade and then powdered by the mechanical mill. The powder obtained from *chamomilla* capitols was mixed with 80% ethanol and then placed in a Soxhlet extractor. *M. chamomilla* alcoholic extract was prepared and MIC of it was obtained against MRSA strains by broth microdilution method. In order to investigate the activity of the efflux pumps phenotypically, all stains were evaluated by ethidium bromide containing agar using Cartwheel method (16). After identification of the strains with an activated efflux pump, the effect of *M. chamomilla* extract on the inhibitory activity of the pump was investigated. For this purpose, the dilutions 1/2 and 1/4 of the MIC of the extract were applied (according to the MIC level of each strain).

Results and Conclusion

According to the results, the highest antibiotic resistance of *S. aureus* strains was respectively related to penicillin (83.3%), cefoxitin (33.3%), while the lowest resistance belongs to chloramphenicol which reported (3.3 %). among 30 *S. aureus* strains, 10 strains (33.3%) were MRSA (Fig. 1). The results of this study and the comparison with other reports on the prevalence of methicillin-resistant strains indicate increased methicillin-resistant strains, one of the reasons of which has been due to the excessive use of antibiotics in recent years. MIC of *M. chamomilla* extract was tested for the studied strains and result obtained between 128-64 µg/ml. The antimicrobial effect of *M. chamomilla* extract and essential oil against a range of bacteria and fungi has been investigated and confirmed (20, 21).

In this study, ethidium bromide cartwheel assay was performed to detect the phenotypic activity of the efflux pump in *S. aureus* strains. Based on the results of this study, three strains were highly active among 30 strains, and did not exhibit fluorescence in all dilutions of ethidium bromide, which means they had strong efflux pumps. Among these three strains, one was MRSA. With the effect of 1/2 MIC of *M. chamomilla* extract on the strains with a strong efflux pumps, the two stains were reported as non-actives. *M. chamomilla* extract on the MRSA strain efflux pump was ineffective. (Figs. 2 and 3). Evaluation of 1/4 MIC of *M. chamomilla* extract had no effect on efflux pump activity. Khan *et al.* (2006) showed that the piperine, a plant alkaloid of the *Piperaceae* family, at a concentration of 25 mg/L reduced two-fold the MIC of *S. aureus* compared to the ciprofloxacin antibiotic. This decrease in MIC is due to the increase in the antibiotic concentration of ciprofloxacin in the bacterium, because of the inhibitory effect of the efflux pumps (28). Smith *et al.* used the Totarol isolated from the immature cones of

Chamaecyparis nootkatensis to inhibit the NorA *S. aureus* pump. They used MIC analysis of ethidium bromide in combination with Totarol to evaluate pump inhibition and reported that the compound studied had antimicrobial activity and also inhibited the NorA pump (26).

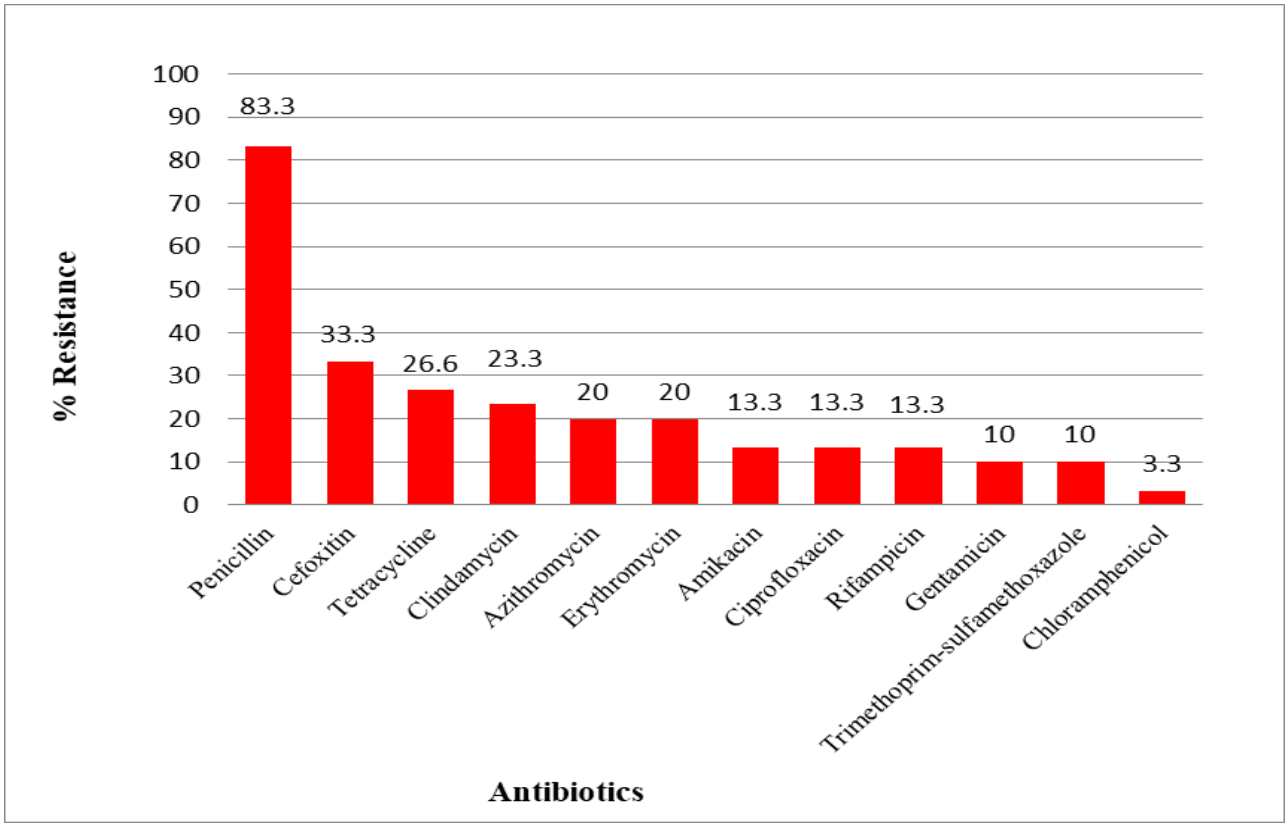


Figure 1. Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* strains

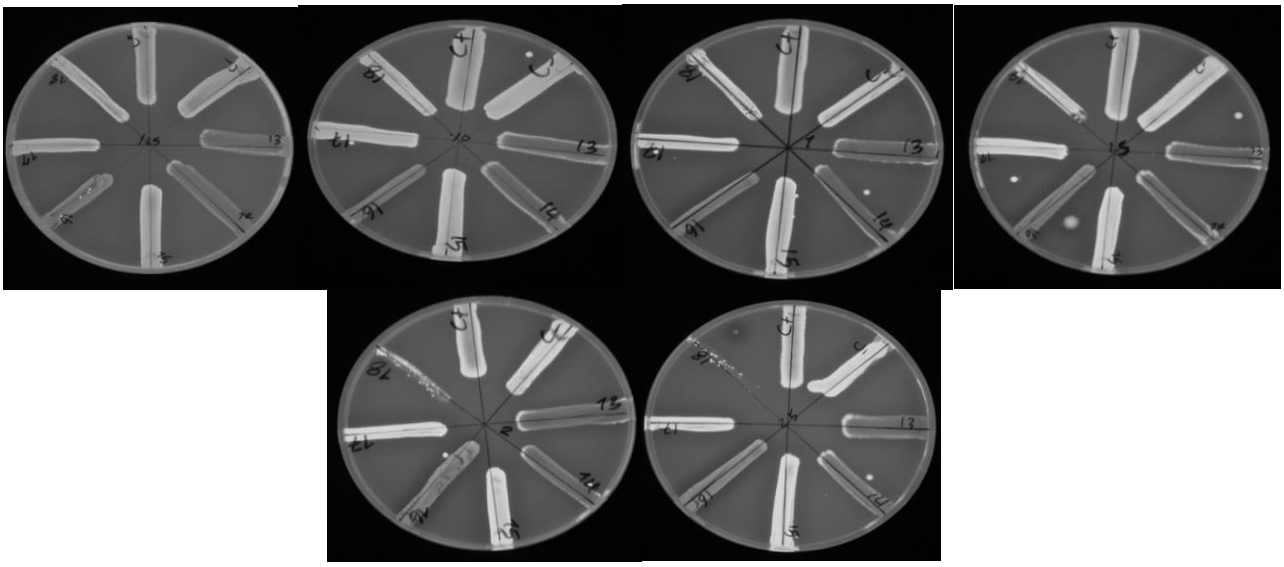


Figure 2. Fluorescent plates containing concentrations of 0.25 to 2.5 g/L of ethidium bromide and microbial suspension of *Staphylococcus aureus* strains: strains 13, 14 and 16 did not show fluorescent activity in all dilutions of ethidium bromide and became known as strong strains. Each growth line belongs to one isolate. Transparent culture lines indicate inactivation of the effluent pump and opaque cultivation lines indicate that the effluent pump system is active. Strain 14 was MRSA.

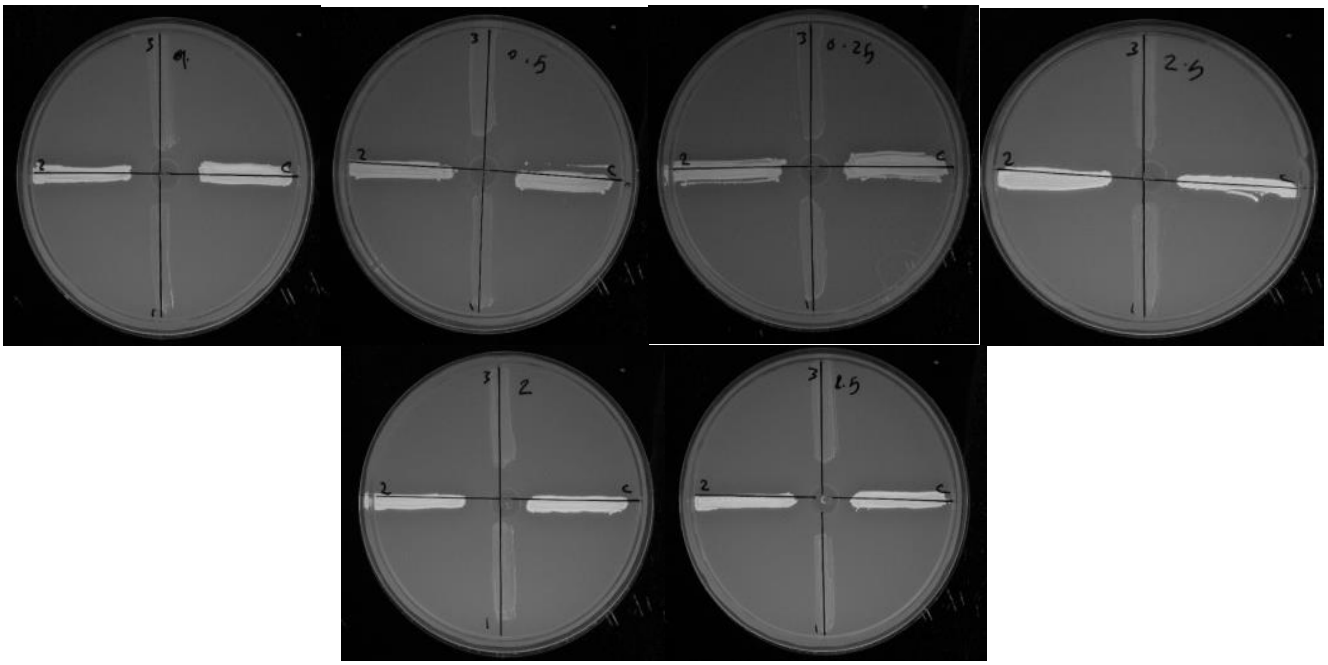


Figure 3. Fluorescent plate images containing ethidium bromide and microbial suspension with MIC concentration of 1/2 *M. chamomilla* extract of each strain: strains 13 and 16 showed fluorescent activity in all dilutions of ethidium bromide and were identified as inactive. MRSA strain 14 remained active.

There are major challenges to find new inhibitors. Considering the antimicrobial effects of plant compounds on inhibiting efflux pump, bacteria that were initially resistant to antibiotics can be sensitive later and, if this approach is successful in the future, it could be considered as an important alternative in the treatment of some infections caused by drug-resistant strains. It is also important to determine the expression level of these genes encoding efflux pumps among phenotypically active isolates, and that the role of synergy between efflux pumps and other antibiotic resistance mechanisms, to achieve this high resistance level, should not be ignored. Further studies are suggested to investigate the genotypic expression of efflux pumps in methicillin-resistant *S. aureus* strains.

Acknowledgements

The authors would like the staff of Microbiology Research Laboratory of Azad Islamic University, Varamin branch and also Mr. Omid Hosseini, the technician of the Research Laboratory of Shahid Beheshty University. The ethical code for this research was IR.IAU.VARAMIN.REC.1396.3.

Conflict of Interest

The authors reported no conflict of interest.

مقاله کوتاه

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ ـ شماره ۳ ـ مرداد و شهریور ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی اثر عصاره الکلی بابونه بر بروز فنوتیپی پمپ‌های تراوشی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین جدا شده از ضایعات پوستی

پرگل عبدی[۱]، معصومه مهدوی اورتاکند[۲]، سحر هنرمند جهرمی[۱]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۱۸

پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۲۳

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۰۵/۲۳

موضوع: مواد ضد میکروبی

IJMM1398;13(3): 220

نویسندهٔ مسئول:

معصومه مهدوی اورتاکند

استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

پست الکترونیک:

asumehmahdavi@gmail.com

چکیده

زمینه و اهدف: سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم‌اند که درمان عفونت‌های ناشی از این سویه‌ها را با مشکل مواجه نموده است. یکی از علل اصلی مقاومت دارویی در باکتری‌ها پمپ‌های تراوشی است. بابونه گیاهانی است که در درمان بیماری‌های پوستی نقش موثر دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره الکلی بابونه بر بروز فنوتیپی پمپ‌های تراوشی سویه‌های MRSA جدا شده از ضایعات پوستی است.

مواد و روش کار: مطالعه روی ۳۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های عفونت‌های پوستی انجام شد. سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین با استفاده از دیسک آنتی بیوتیک سفوکسیتین شناسایی شدند. عصاره الکلی بابونه استخراج شد و MIC آن برعلیه سویه‌های MRSA، به روش میکروبراث دایلوشن براث تعیین شد. روش کارت ویل برای بررسی فعالیت فنوتیپی پمپ تراوشی به کار برده شد. اثر عصاره بابونه روی سویه‌های دارای پمپ‌های تراوشی فعال انجام شد.

یافته‌ها و بحث: از بین سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی، ۳۳/۳٪ سویه‌ها مقاوم به متی‌سیلین بودند. سه سویه (۱۰٪) دارای پمپ تراوشی فعال بودند که از این میان یک سویه MRSA بود. MIC عصاره بابونه روی سویه‌های MRSA بین ۶۴-۱۲۸ µg/mL بود. با تأثیر غلظت 1/2 MIC عصاره روی سویه های دارای پمپ افلاکس قوی، پمپ تراوشی ۲ سویه غیرفعال گزارش شد. عصاره بابونه روی پمپ تراوشی سویه MRSA بی‌تاثیر بود. براساس نتایج این مطالعه اثر ضدمیکروبی عصاره بابونه سویه‌های MRSA جدا شده از ضایعات پوستی تایید شد.

کلید واژه‌ها: بابونه، فنوتیپ، MRSA ، مقاومت آنتی بیوتیکی، مواد ضد میکروبی

کپی‌رایت © مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل مهم در عفونت‌های بیمارستانی است و در بسیاری از موارد از عفونت‌های پوستی منشاء می‌گیرد و ۳۰ درصد افراد ناقل این باکتری می‌باشند (۱). عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، مراقبت و درمان زخم‌ها، پوست و نسج نرم آسیب دیده را با مشکل مواجه می‌سازد (۲). *استافیلوکوکوس*های مقاوم به متی‌سیلین عامل عمده کلونیزاسیون و ایجاد عفونت در زخم‌های حاد و مزمن بافت نرم می‌باشند. مقاومت به متی سیلین نشان‌دهندهٔ مقاومت متی سیلین نشان‌دهندهٔ مقاومت به تمام سفالوسپورین‌ها و پنی‌سیلین‌های مقاوم به پنی‌سیلیناز است. بیماران آلوده با *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) می‌توانند این ارگانیسم را به دیگران نیز انتقال دهند که این مسأله می‌تواند باعث افزایش خطر عفونت شود (۳). بیماران آلوده با *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) می توانند این ارگانیسم را به دیگران نیز انتقال دهند که این مساله می تواند باعث افزایش خطر عفونت شود (۴). پمپ‌های تراوشی یکی از توانایی‌های این باکتری برای مقاوم شدن به آنتی بیوتیک هاست (۵). در طی این فرآیند باکتری، ترکیبات خارج سلولی سمی مانند داروها، مواد شیمیایی را به خارج سلول دفع و از ایجاد غلظت کشنده برای باکتری جلوگیری می‌نماید. پمپ‌های تراوشی نه تنها باعث افزایش MIC آنتی‌بیوتیک‌ها بلکه با کاهش غلظت دارو در داخل سلول منجر به ایجاد سویه‌های موتانت مقاوم در باکتری‌ها می‌گردند به همین دلیل از مهمترین چالش‌های پیش‌روی برای محققان یافتن راهی برای مهار سیستم‌های پمپ تراوشی است (۶). در داخل گیاهان ترکیباتی به صورت همکار با مواد ضد میکروبی عمل می‌کنند

و مسئول مختل کردن عملکرد پمپ‌های تراوشی پاتوژن‌های گیاهی هستند در نتیجه استفادهٔ همزمان از یک مهارکننده مناسب پمپ‌های تراوشی به همراه مواد ضد میکروبی گیاهی ممکن است بتوانند مخلوطی قابل رقابت با آنتی‌بیوتیک‌های گسترده طیف و رایج کنونی باشد (۷).

مطالعات بسیاری اثر مهاری برخی از اسانس‌های گیاهی در پمپ‌های تراوشی را در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی کرده‌اند (۸ -۱۰). از روش‌هایی که بر پایهٔ استفاده از یک سوبسترای مناسب فعالیت پمپ‌های تراوشی به نام اتیدیوم بروماید (EtBr) است، می‌توان به روش کارت ویل (Cartwheel method) اشاره کرد. روش سنجش فلورومتریک کارت ویل بر پایهٔ عبور اتیدیوم بروماید از عرض غشای سیتوپلاسمی و تجمع درون سلول باکتریایی است (۱۱، ۱۲).

از طرفی برخی از گیاهان در درمان بیماری‌های پوستی نقش داشته و اثرات آنها اثبات شده است که از آن جمله می‌توان به گیاه بابونه اشاره کرد. بابونه با نام علمی *Matricaria chamomilla*، گیاهی از تیره آفتاب‌گردان است. به دلیل حضور برخی ترکیبات خاص در بابونه بر روی آن مطالعات زیادی روی آن انجام گرفته و مشخص شده است که دارای خواص متنوعی چون ضد التهاب، ضد میکروب، آرام-بخش، ضد اسپاسم و غیره می‌باشد. بیزابولول به عنوان مهمترین ترکیب شیمیائی در عصاره این گیاه دارای اثرات ضد میکروبی است. نتایج بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که عصاره بابونه اثرات ضدالتهابی دارد. علاوه بر این گیاه بابونه غنی از فلاوونوییدها است که آنتی اکسیدان‌های موثری در خنثی کردن رادیکال های آزاد اکسیژن دار می باشند که می تواند در بهبود زخم موثر باشد . اثر ضدمیکروبی عصاره و اسانس گیاه بابونه بر علیه طیف وسیعی از باکتری ها و قارچ ها از جمله *Bacillus, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Listeria innocua, Salmonella enteric, Shigella dysenteria, Staphylococcus aureus, Staphylococcus camorum, Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus pyogenes, Aspergillus niger, Candida albicans* بررسی و تائید شده است (۱۳ ، ۱۴). تحقیقات نشان می‌دهد که برخی ترکیباتی در گیاهان وجود دارد که با عملکرد ضدمیکروبی، مسئول مختل کردن عملکرد پمپ‌های تراوشی در پاتوژن‌های گیاهی هستند و استفاده از این ترکیبات گیاهی می‌تواند موجب مهار پمپ‌های تراوشی سایر میکروارگانیسم‌ها شود (۱۵). به این منظور این مطالعه با هدف بررسی اثر عصاره الکلی بابونه بر بروز فنوتیپی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از ضایعات پوستی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و شناسایی باکتری‌ها

این مطالعه توصیفی مقطعی روی ۳۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جمع آوری شده از ۱۰۴ بیمار مبتلا به زخم‌های پوستی مراجعه کننده به بیمارستان شریعتی تهران به روش تصادفی در بهار سال ۹۶ انجام شد. نمونه‌گیری با سواپ‌های استریل از عفونت‌های پوستی تشخیص داده شده توسط پزشکان متخصص پوست و عفونی انجام شد.. نمونه گیری با اخذ رضایت‌نامه از بیمار و پس از تکمیل پرسشنامه انجام گرفت. نمونه ها توسط تست های بیوشیمیایی افتراقی شامل رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، کواگولاز، DNAse و تخمیر مانیتول شناسایی و جداسازی شد. نمونه استاندارد جهت کنترل کیفی سویه‌ها در این تحقیق *Staphylococcus aureus* ATCC 25923بود که به صورت لیوفیلیزه از کلکسیون میکروبی ایران خریداری شد.

تست تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی و تعیین سویه‌های MRAS

مقاومت سویه‌های مطالعه به ۱۲ آنتی بیوتیک و به روش انتشار از دیسک، براساس استانداردهای CLSI, 2017 با استفاده از کشت برروی محیط مولر هینتون آگار (مرک- آلمان) تعیین شد. دیسک‌های آنتی بیوتیکی که از شرکت پادتن طب (ایران) تهیه شد. جهت شناسایی فنوتیپی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین، حساسیت نمونه باکتری مورد نظر را نسبت به آنتی بیوتیک سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) و بر اساس قطر هاله ایجاد شده در اطراف دیسک در محیط مولر هینتون مورد بررسی قرار گرفت.

تهیه عصاره الکلی گیاه بابونه

کاپیتول‌های گیاه بابونه *(Matricaria chamomilla)* از شهرستان اردبیل جمع‌آوری گردید و پس از شناسایی تاکسونومیکی توسط متخصص سیستماتیک گیاهی، نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در سایه خشک گردید و سپس توسط آسیاب به صورت پودر درآمد. پودر حاصله از کاپیتول‌های گیاه بابونه با اتانول ۸۰ درصد مخلوط شد و سپس در دستگاه سوکسله قرار داده شد. عصاره الکلی به دست آمده توسط دستگاه روتاری خشک گردید. از عصاره‌های الکلی پس از تغلیظ در دستگاه تقطیر در خلاء در نهایت ۳ میلی‌لیتر عصاره غلیظ بدست آمد. میانگین وزن خشک عصاره‌های الکلی ۸۰ میلی‌گرم در میلی-لیتر بود که با توجه به آن رقت‌های مختلف عصاره‌ها محاسبه شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره بابونه

استوک اولیه عصاره با رقت ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر توسط محلول ۵ درصد DMSO رقیق شد تعیین MIC به روش میکرودایلوشن براث و با استفاده از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۲۵۶ - ۰/۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره براساس روش سریال دایلوشن به یک ردیف از چاهک‌ها افزوده شد. سوسپانسیون میکروبی که با نیم مک فارلند برابر شده بود به وسیله محیط کشت مولر هینتون براث به میزان ۱/۱۰۰ جهت به دست آوردن تعداد 1×10^{6} CFU/ml رقیق شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن را به هر چاهک افزوده شد. در این آزمون به منظور کنترل منفی، از محیط کشت خالی (بدون عصاره و سوسپانسیون میکروبی) استفاده گردید. همچنین سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت بدون عصاره به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. میکروپلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰-۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از این مدت پایین‌ترین غلظتی که در آن هیچگونه رشد باکتری مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تعیین شد. تمامی این مراحل برای سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین با ۳ تکرار انجام شد.

بررسی فنوتیپی فعالیت پمپ تراوشی به روش کارت ویل

به‌منظور بررسی فعالیت پمپ‌های افلاکس به‌صورت فنوتیپی تمامی سویه های MRAS با تکنیک آگار حاوی اتیدیوم – بروماید با روش کارت ویل مورد بررسی قرار گرفتند. در این روش کمترین میزان فلورسنس باکتری‌ها باید تعیین شود. ابتدا محلول پایه اتیدیوم بروماید (شرکت مرک، آلمان) در آب مقطر و به غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شده و در دمای ۴ درجهٔ سانتی گراد نگهداری شد. کشت شبانه روزی از سویه های مورد بررسی در ۵ میلی‌لیتر محیط به کشت مایع تهیه شد و پس از ۲۴ ساعت غلظت آن با PBS به استاندارد ۰/۵ مک فارلند رسانده شد. پلیتهای حاوی محیط کشت نوترینت آگار(شرکت مرک، آلمان) همراه با غلظت‌های اتیدیوم بروماید از ۰/۲۵ تا ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر آماده شد و در مقابل نور محافظت گردید. یکی از پلیت‌ها فاقد اتیدیدوم بروماید بود. سویه‌ها بر روی پلیت‌های نوترینت آگار حاوی غلظت های متفاوت، از ۰/۲۵ تا ۲/۵ میلی گرم بر لیتر اتیدیوم بروماید به‌صورت یک خط‌کشت داده شدند. غلظت‌ها وابسته به نوع باکتری بوده و قابل تغییر هستند. کمترین غلظت ممانعت کننده رشد (MIC) نیز ۲ میلی‌گرم در لیتر در نظر گرفته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. هر پلیت نوترینت آگار حاوی اتیدیوم بروماید می‌تواند شامل ۱۲ جدایه باکتری باشد. میزان فلوروسنس هر جدایه با دستگاه ژل داک (شرکت کیاژن ساخت ایران) اندازه‌گیری شد تا کمترین غلظت اتیدیوم بروماید مؤثر بر باکتری مشخص گردد. کنترل مثبت سویه هایی است که دارای بیشترین خاصیت فلوروسنس (بیانگر عدم فعالیت افلاکس یا فعالیت فیزیولوژیک افلاکس) می‌باشد. کنترل منفی شامل سویه هایی است که فاقد خاصیت فلوروسنس یا فعالیت خیلی کم‌فلوروسنس (نشانگر فعال بودن افلاکس) می باشند (۱۶).

بررسی اثر عصاره بابونه بر فعالیت پمپ‌های تراوشی به روش کارت ویل

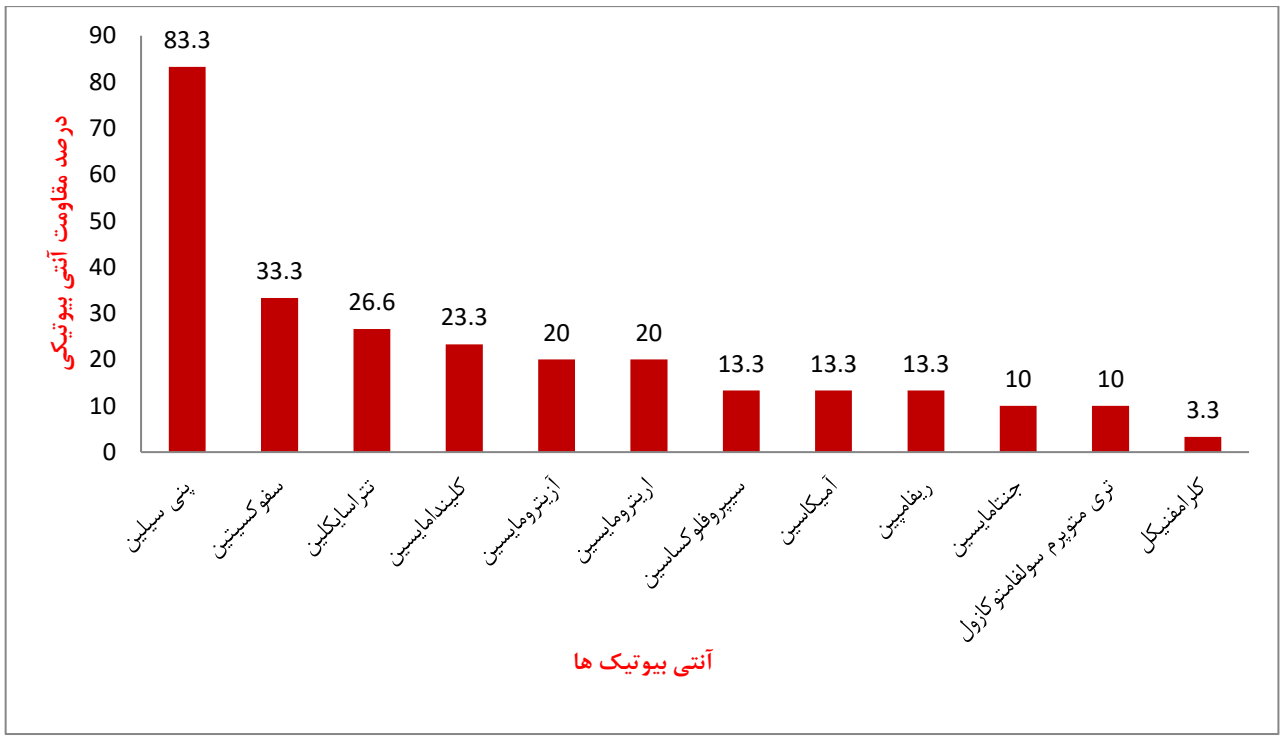
پس از مشخص شدن سویه‌های دارای پمپ تراوشی فعال، اثر عصاره بر مهار فعالیت پمپ تراوشی بررسی شد. برای این منظور، از رقت-های یک دوم و یک چهارم MIC عصاره مورد مطالعه (با توجه میزان MIC هر سویه) استفاده شد. پس از تعیین MIC برای هر سویه، غلظت-های یک دوم MIC عصاره محاسبه شد و توسط محلول ۵ درصد DMSO به حجم ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی لیتر رسانده شدند. محلول تهیه شده، به محیط کشت نوترینت آگار حاوی غلظت ۰/۲۵ تا ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر اتیدیوم بروماید اضافه شد و باکتری‌ها به‌صورت خطی از مرکز به سمت کناره‌های محیط کشت داده شد. پس از انکوباسیون پلیت‌ها میزان فلوروسنت هر پلیت با دستگاه ژل داک بررسی شد و سویه‌هایی که دارای بیش‌ترین میزان فلورسنت در رقت ۰/۲۵ اتیدیوم بروماید در حضور عصاره بودند به‌عنوان تراوشی فعال در نظر گرفته شدند. سویه‌هایی که با تأثیر رقت یک دوم MIC عصاره، پمپ تراوشی آنها همچنان فعال بود، در مرحله بعد، همان سویه مجدداً، تحت تأثیر رقت یک چهارم MIC عصاره قرار گرفت و اثر این رقت هم بر مهار فعالیت تراوشی پمپ‌های فعال، به روش ذکر شده در بالا، مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها و بحث

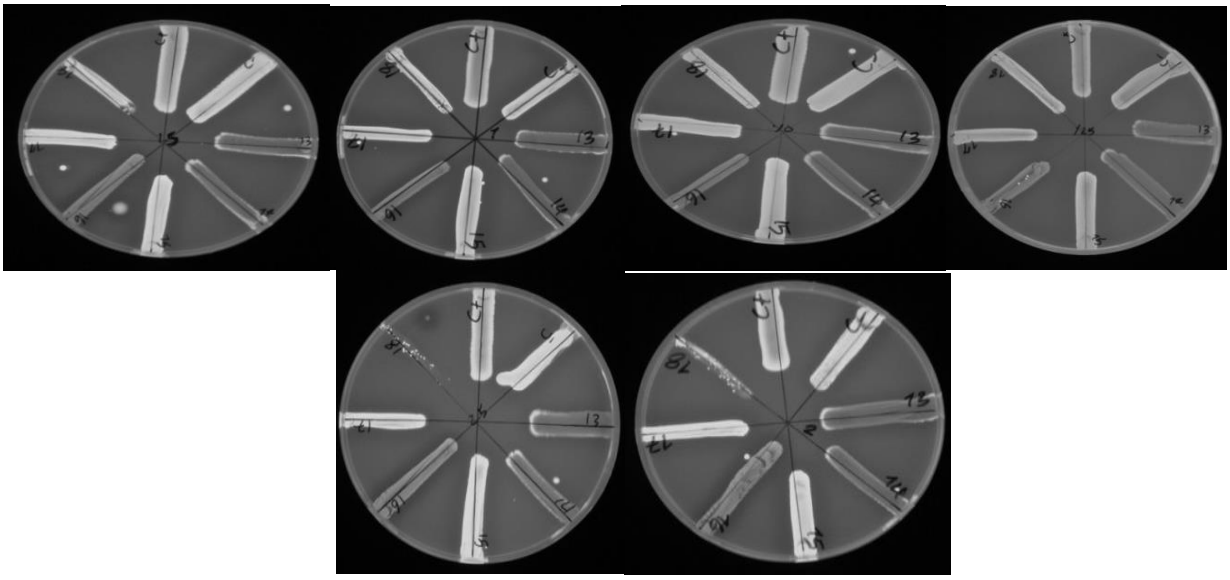
از میان ۱۰۴ بیمار مطالعه شده در این تحقیق، پس از انجام تستهای تشخیصی، ۳۰ نفر (۳۸/۴۶ ٪) از بیماران آلوده به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند که از این میان ۱۰ نفر زن و ۲۰ نفر مرد بودند. نتایج تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* جدا شده از زخم‌های پوستی نشان داد که بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین ۸۳/۳٪، و سفوکسیتین۳۳/۳٪ داشتند وکمترین مقاومت به کلرامفنیکل۳/۳٪ گزارش شد. بر این اساس از بین ۳۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی، ۱۰ سویه (۳۳/۳ ٪) MRSA

بودند (شکل ۱). مطالعات مختلفی جهت بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شده است (۱۷). Fagheei-Aghmiyuni و همکارانش در سال ۲۰۱۷ مطالعه ای را به منظور تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از عفونت های پوست در بیماران مراجعه کننده به بیمارستان پوست رازی تهران انجام دادند که نتایج این تحقیق نشان داد ۴۶/۸ درصد از سویه‌ها MRSA و ۹۴/۶ درصد مقاوم به پنی‌سیلین بودند (۱۸). در مطالعه Motamedi و همکارانش، ۴۶/۷ درصد از نمونه-های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین از عفونت پوست جدا شده بود و بیش از ۴۶ درصد ایزوله‌ها مقاوم به متی‌سیلین بود (۱۹).

اثر ضدمیکروبی عصاره بابونه روی سویه های MRSA بررسی شد و MIC آن برای ۱۰سویه بررسی و بین ۶۴- ۱۲۸ µg /ml گزارش و تایید شد. اثر ضدمیکروبی عصاره و اسانس گیاه بابونه بر علیه طیف وسیعی از باکتری ها و قارچ ها بررسی و تائید شده است (۲۰، ۲۱). یکی از مکانیسم‌های تائید شده در مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نقش پمپ‌های تراوشی است که مانع از تجمع دارو درون سلول می‌شود (۲۲ ، ۲۳). یک روش ساده برای بررسی فنوتیپی پمپ افلوکس، استفاده از روش کارت ویل اتیدیوم بروماید است (۲۴). در مطالعه کنونی، سنجش کارت ویل اتیدیوم بروماید برای شناسایی فنوتیپی فعالیت پمپ تراوشی در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام گردید. نتایج نشان داد که از ۳۰ سویه مورد بررسی، ۳ سویه دارای پمپ افلوکس بسیار فعال بوده، یعنی تراوشی قوی داشتند و در میان این سه سویه، یک سویه MRSA بود. سایر سویه‌ها از نظر پمپ تراوشی غیر فعال گزارش شدند (شکل ۲). Patel و همکارانش در ۲۰۱۰، فعالیت پمپ افلوکس را در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از اتیدیوم بروماید فعالیت مورد مطالعه قراردادند. نتایج این مطالعه نشان داد که این روش برای تشخیص فعالیت پمپ تراوشی ۹۲ ٪ اختصاصی می‌باشد و فعالیت آن مرتبط با بیان ژن *NorA* می‌باشد (۲۵).

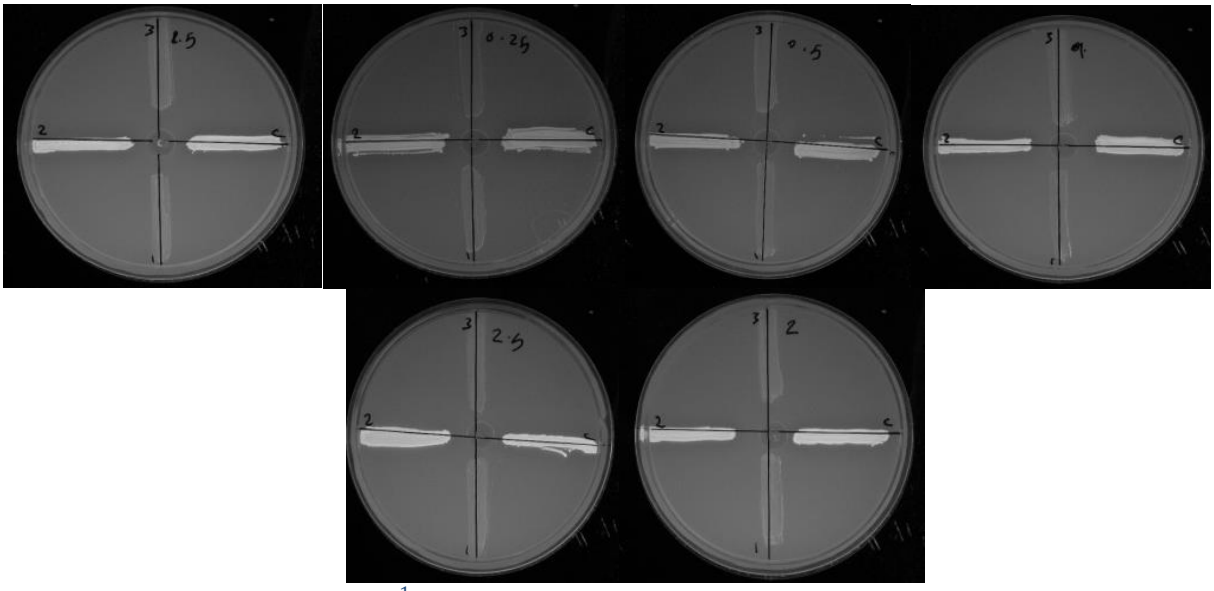


شکل ۱: نمودار درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس*



شکل ۲- تصاویر فلورسنت پلیت های حاوی غلظت‌های ۰/۲۵ تا ۲/۵ گرم برمیلی لیتر از اتیدیوم بروماید و سوسپانسیون میکروبی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*: سویه شماره ۱۳، ۱۴ و ۱۶ در تمام رقت های اتیدیوم بروماید خاصیت فلورسنت نشان ندادند و به عنوان سویه قوی شناخته شدند. هر خط رشد متعلق به یک جدایه می باشد. خطوط کشت شفاف بیانگر عدم فعالیت پمپ تراوشی و خطوط کشت مات بیانگر فعال بودن سیستم تراوشی پمپ می باشد. سویه شماره ۱۴ MRSA بود.

در ادامه بررسی حاضر، اثر عصاره بابونه بر فعالیت پمپ‌های تراوشی سویه‌ها دارای پمپ فعال مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده شد که از ۳ سویه دارای تراوشی قوی پس از تأثیر غلظت یک دوم MIC عصاره بابونه، پمپ تراوشی ۲ سویه غیر فعال شد که مساله نشان دهنده موثر بودن عصاره روی پمپ تراوشی این سویه‌ها می‌باشد. عصاره بابونه روی پمپ تراوشی سویه ۱۴ که یک سویه MRSA بود بی‌تاثیر گزارش شد و این پمپ همچنان دارای پمپ تراوشی فعال بود (شکل ۳). بررسی غلظت یک چهارم MIC عصاره بابونه، تاثیری بر فعالیت تراوشی پمپ‌ها نداشت. Smith و همکارانش از ترکیب فنلی توتارول مشتق شده از درخت سرو جهت مهار پمپ *NorA* *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده کردند. آنها جهت سنجش میزان مهار پمپ، از روش کاهش MIC از اتیدیوم بروماید و آنتی بیوتیک فلوروکینولون در ترکیب با MIC/4 توتارول استفاده کردند و در نهایت گزارش نمودند که ماده مورد مطالعه خاصیت ضد میکروبی دارد و هم موجب مهار پمپ *NorA* می‌شوند (۲۶). در مطالعه دیگری اثر اسانس آویشن دنایی (*Thymus daenensis*) بر روی مهار پمپ *NorA* باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را مطالعه شد. نتایج نشان داد که این اسانس گیاهی می‌تواند باعث افزایش خاصیت ضدباکتریایی آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* شود (۲۷). Khan و همکارانش نشان دادند که آلکالوئید گیاهی پیپرین مربوط به گیاهان خانواده Piperaceae در غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر باعث کاهش دو برابری MIC باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین می شود. این کاهش MIC مربوط به افزایش غلظت آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین درون باکتری، در نتیجه‌ی خاصیت مهارکنندگی پمپ‌های تراوشی می‌باشد (۲۸).



شکل ۳- تصاویر فلورسنت پلیت حاوی اتیدیوم بروماید و سوسپانسیون میکروبی به همراه غلظت MIC $\frac{1}{2}$ عصاره بابونه هر سویه. سویه شماره ۱۳ و ۱۶ در تمام رقت های اتیدیوم بروماید خاصیت فلورسنت نشان دادند و به عنوان سویه غیرفعال شناخته شدند و سویه شماره ۱۴ که MRSA بود همچنان فعال ماند.

(-) به معنای عدم فعالیت ضدمیکروبی است.

چالش‌های عمده ای برای یافتن ممانعت‌گرهای جدید وجود دارد و با توجه به اثرات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی در مهار پمپ‌های تراوشی، باکتری‌هایی که در ابتدا به آنتی‌بیوتیک ها مقاوم بودند، می‌توانند حساس گردند و در صورتی که این رویکرد در آینده موفقیت آمیز باشد، می‌تواند به عنوان یک جایگزین مهم در درمان برخی از مهمترین عفونت‌های ناشی از سویه های مقاوم به دارو استفاده گردد. تعیین میزان بیان این ژن‌های کدکنندهٔ پمپ‌های تراوشی در بین ایزوله‌های فعال از نظر فنوتیپی نیز حائز اهمیت است و نقش سینرژی بین پمپ‌های تراوشی با سایر مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای رسیدن به این میزان بالای مقاومت در بین سویه-های *استافیلوکوکوس اورئوس* های مقاوم به متی سیلین نباید نادیده گرفته شود و به مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است. مطالعات تکمیلی جهت بررسی بیان ژنوتیپی پمپ‌های تراوشی در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین پیشنهاد می شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مسئول و کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین پیشوا و جناب آقای امید حسینی کارشناس آزمایشگاه جامع تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی که ما را در اجرای این پژوهش یاری کردند، تقدیر و تشکر میشود. کد اخلاق مربوط به نمونه های مطالعه شده IR.IAU.VARAMIN.REC.1396.3 است.

تعارض در منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Imanifooladi AA, Sattari M, Peerayeh SN, Hassan ZM, Hossainidoust SR. Detection the *Staphylococcus aureus* producing enterotoxin isolated from skin infections in hospitalized patients. Pakistan journal of biological sciences. PJBS 2007; 10(3):502-5. [DOI:10.3923/pjbs.2007.502.505] [PMID]
2. Shahidi-Dadras M, Toossi P, Sarrafi-Rad N, Robati RM, Saeedi M, Kavand S. *Staphylococcus aureus* carriage in patients with psoriasis. Iranian Journal of Dermatology. 2009;12(1):1-3.
3. Jappe U. Superantigens and their association with dermatological inflammatory diseases: facts and hypotheses. Acta dermato-venereologica. 2000; 80(5):321-8. [DOI:10.1080/000155500459231] [PMID]
4. Tomi NS, Kränke B, Aberer E. Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. Journal of the American Academy of Dermatology. 2005; 1;53(1):67-72. [DOI:10.1016/j.jaad.2005.02.034] [PMID]
5. Webber MA, Piddock LJ. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2003; 1;51(1):9-11. [DOI:10.1093/jac/dkg050] [PMID]

6. Blanco P, Hernando-Amado S, Reales-Calderon J, Corona F, Lira F, Alcalde-Rico M, Bernardini A, Sanchez M, Martinez J. Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. Microorganisms. 2016 4(1): [DOI:10.3390/microorganisms4010014] [PMID] [PMCID]

7. Gibbons S. Phytochemicals for bacterial resistance-strengths, weaknesses and opportunities. Planta medica. 2008; 74(06):594-602. [DOI:10.1055/s-2008-1074518] [PMID]

8. Stavri M, Piddock LJ, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. Journal of antimicrobial chemotherapy. 2006; 4;59(6):1247-60. [DOI:10.1093/jac/dkl460] [PMID]

9. Gibbons S, Oluwatuyi M, Kaatz GW. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2003; 1;51(1):13-7. [DOI:10.1093/jac/dkg044] [PMID]

10. Tegos G, Stermitz FR, Lomovskaya O, Lewis K. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2002; 1;46(10):3133-41. [DOI:10.1128/AAC.46.10.3133-3141.2002] [PMID] [PMCID]

11. Pumps E, Cost F, RamA B. Efflux pumps of gram-negative bacteria: genetic responses to stress and the modulation of their activity by pH, inhibitors, and phenothiazines. Advances in enzymology and related areas of molecular biology. 2011; 15;238:61. [DOI:10.1002/9780470920541.ch2]

12. Amaral L, Cerca P, Spengler G, Machado L, Martins A, Couto I, et al. Ethidium bromide efflux by Salmonella: modulation by metabolic energy, pH, ions and phenothiazines. International journal of antimicrobial agents. 2011; 38(2): 140-5. [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2011.03.014] [PMID]

13. Abdoul-Latif FM, Mohamed N, Edou P, Ali AA, Djama SO, Obame LC, Bassolé IH, Dicko MH. Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and methanol extract of Matricaria chamomilla L. from Djibouti. Journal of Medicinal Plants Research. 2011; 4;5(9):1512-7.

14. Charousaei F, Dabirian A, Mojab F. Using chamomile solution or a 1% topical hydrocortisone ointment in the management of peristomal skin lesions in colostomy patients: results of a controlled clinical study. Ostomy-Wound Management. 2011; 1;57(5):28.

15. Sharifi A, Mohammadzadeh A, Mahmoodi P, Sasanian N. Inhibitory Effect of Thymus daenensis Essential Oil on *Staphylococcus aureus* NorA Efflux Pump. J Adv Med Biomed Res. 2016; 24 (105) :67-77

16. Martins M, McCusker MP, Viveiros M, Couto I, Fanning S, Pagès JM, Amaral L. A simple method for assessment of MDR bacteria for over-expressed efflux pumps. The open microbiology journal. 2013; 7:72. [DOI:10.2174/1874285801307010072] [PMID] [PMCID]

17. Movagharnezhad M, khataminezhad M R. Identification and Characterization of *Staphylococcus aureus* Methicillin and Vancomycin Resistance From Patients in Sari and Ghaemshahr Injuries and Burn Hospitals in 2015. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (3) :160-168 [DOI:10.30699/ijmm.12.3.160]

18. Fagheei-Aghmiyuni Z, Khorshidi A, Soori T, Moniri R, Mousavi S G A. Antibiotic susceptibility pattern and the prevalence of *Staphylococcus aureus* isolated from skin and soft tissue in Tehran Razi skin hospital (2014-15). Feyz. 2017; 21 (2) :188-196

19. Motamedi H, Rahmat Abadi SS, Moosavian SM, Torabi M. The Association of PantonValentine leukocidin and mecA Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates From Patients Referred to Educational Hospitals in Ahvaz, Iran. Jundishapur J Microbiol 2015; 8(8). [DOI:10.5812/jjm.22021v2] [PMID] [PMCID]

20. Jarrahi M, Vafaei AA, Taherian AA, Miladi H, Rashidi Pour A. Evaluation of topical Matricaria chamomilla extract activity on linear incisional wound healing in albino rats. Natural product research. 2010; 10;24(8):697-702. [DOI:10.1080/14786410701654875] [PMID]

21. Roby MH, Sarhan MA, Selim KA, Khalel KI. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (Foeniculum vulgare L.) and chamomile (Matricaria chamomilla L.). Industrial crops and products. 2013; 1(44):437-45. [DOI:10.1016/j.indcrop.2012.10.012]

22. Piddock LJ, Garvey MI, Rahman MM, Gibbons S. Natural and synthetic compounds such as trimethoprim behave as inhibitors of efflux in Gram-negative bacteria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2010; 19; 65(6):1215-23. [DOI:10.1093/jac/dkq079] [PMID]

23. Haddadi Zahmatkesh M A, Laripoor M, Mirzaie A, Ashrafi F. Prevalence of norA and norB efflux pump genes in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and their contribution in ciprofloxacin resistance. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (5) :20-30

24. Martins M, Viveiros M, Couto I, Costa SS, Pacheco T, Fanning S, Pages JM, Amaral L. Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the ethidium bromide-agar cartwheel method. in vivo. 2011; 1;25(2):171-8.

25. Patel D, Kosmidis C, Seo SM, Kaatz GW. Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010; 1;54(12):5070-3. [DOI:10.1128/AAC.01058-10] [PMID] [PMCID]

26. Smith EC, Kaatz GW, Seo SM, Wareham N, Williamson EM, Gibbons S. The phenolic diterpene totarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2007; 1;51(12):4480-3. [DOI:10.1128/AAC.00216-07] [PMID] [PMCID]

27. Sana M, Jameel H, Rahman M. Miracle remedy: Inhibition of bacterial efflux pumps by natural products. Journal of Infectious Diseases & Therapy. 2015; 30. [DOI:10.4172/2332-0877.1000213]

28. Khan IA, Mirza ZM, Kumar A, Verma V, Qazi GN. Piperine, a phytochemical potentiator of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2006; 1;50(2):810-2. [DOI:10.1128/AAC.50.2.810-812.2006] [PMID] [PMCID]