اثر ضد بیوفیلم پپتید ملیتین بر سویه های استافیلوکوکوس اورئوس تولیدکننده بیوفیلم جدا شده از عفونت سوختگی بیمارستانی

راضیه رضایی نژاد[۱]، پروانه بوالیان[۲] ، رضا اکبری[۳] ، کامران پوشنگ باقری[۲*]

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد نائین، دانشگاه آزاد اسلامی، نائین، ایران
۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، انستیتو پاستور ایران
۳-گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
***نشانی برای مکاتبه:** تهران، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، تلفن و نمابر: ۶۶۴۸۰۷۸۰، کد پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، k_bagheri@pasteur.ac.ir

دریافت مقاله: مرداد نود و شش پذیرش برای چاپ: ابان نود و شش

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلو کوکوس اورئوس یک عامل بیماریزای خطرناک و یک پاتوژن مهم در موسسات درمانی و بهداشتی در سطح جهان بوده و از عوامل مهم در ایجاد عفونت سوختگی به شمار می رود. امروزه تعداد استافیلو کوکوس اورئوس‌های مقاوم به تمام آنتی بیوتیک‌ها رو به افزایش است و به همین دلیل پیشنهاد می شود که برای درمان عفونت‌های میکروبی از پپتیدهای ضد میکروبی استفاده شود. لذا هدف از این تحقیق تعیین اثر تخریبی و آنتی باکتریال ملیتین استخراج شده از زهر زنبور عسل ایرانی بر بیوفیلم تولید شده و سویه‌های بیوفیلم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت سوختگی بیمارستانی شهید مطهری است.*

روش کار: *در این مطالعه ۵۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس از بیمارستان مطهری جمع آوری گردید و با روش‌های بیوشیمیایی و میکروب شناسی تشخیص داده شد. پپتید ملیتین با تکنیک کروماتوگرافی فاز معکوس (RP-HPLC) از زهر آماده شده تخلیص و لیوفیلیزه شد و سپس غلظت آن با روش بیسینکونینیک اسید تعیین شد. سویه استاف را در محیط TSBبا گلوکز کشت داده و سپس با رنگ کریستال ویوله، بیوفیلم رنگ آمیزی گردید. سپس OD آن را قرائت شد. افزایش OD نسبت به محیط کنترل (TSB بدون گلوکز) نشان دهنده تشکیل بیوفیلم بود. سپس MIC و MBCملیتین بر سویه‌های بیوفیلم مثبت تعیین شد. در مرحله بعد، توانایی تخریب بیوفیلم توسط ملیتین در غلظت‌های MIC,0.1MIC,0.01MIC به روش رنگ سنجی بررسی گردید. در چاهک های جداگانه غلظت های MIC فوق بکار برده شد و سپس کشت انجام گردید.*

یافته ها: *حدود ۲۰ پیک در کروماتوگرام HPLC مشاهده شد. بیشترین سطح زیر منحنی بین فراکشن های موجود، مربوط به ملیتین بود که تقریبا ۶۳/۸٪ از مساحت کل فراکشن ها را به خود اختصاص داده بود. میانگین کل تولید بیوفیلم برابر با ۲/۳۵ بود. با اضافه کردن ملیتین میزان OD کاهش یافت که این نتیجه نشان دهنده ی تخریب بیوفیلم باکتری می باشد. میانگین کل OD در تمام سویه ها در ۱ MIC برابر با ۱/۳۹ بود.*

نتیجه گیری: *پپتید ملیتین با تکنیک HPLC فاز معکوس با خلوص بالایی تخلیص شد. اکثر سویه‌های کلینیکی استافیلوکوکوس اورئوس تولید کننده بیوفیلم بودند. ملیتین توانست در مدت کوتاهی در عرض ۲ ساعت باعث تخریب بیوفیلم باکتری‌ها گردد. ملیتین در دوز MIC قادر به از بین بردن باکتری‌های داخل بیوفیلم می باشد که این مقدار دوز غیر سمی محسوب می شود. مقایسه مطالعات مختلف بین المللی با نتایج این تحقیق نشان می دهد که پپتید ملیتین از لحاظ قدرت مهاری و میکروب¬کشی از آنتی بیوتیک های دیگر قوی¬تر بوده (۱۴،۱۵) و این موضوع ثابت می¬کند که بررسی بر روی ملیتین ارزش تحقیقی و صنعتی زیادی دارد.*

واژگان کلیدی: بیوفیلم، استافیلوکوکوس اورئوس، پپتیدهای آنتی میکروبیال، ملیتین، کروماتوگرافی HPLC

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن مهم در بیماریهای انسانی بوده و عامل طیف وسیعی از عفونتهای معمولی تا شدید است(۱). سویههای MRSA که امروزه در برابر اکثر آنتی بیوتیکها مقاوم هستند عموما در بیمارستانها یافت می شوند. همچنین عفونتهای اکتسابی از جامعه به شکل چشمگیری در حال گسترش می باشند(۲). خط عفونتها MRSA نه تنها به ظهور مقاومت به چند دارو می انجامد بلکه باعث ایجاد توانایی در این باکتری برای تولید بیوفیلم نیز می گردد(۳).

وون و همکاران ثابت کردند که میزان مثبت بودن بیوفیلم برای سویه های MRSA به طور معنی داری بیشتر از سویههای حساس به متی سیلین بود (۴). استافیلو کوکوس به ویژه سویههای MRSA از جمله عوامل اصلی عفونتهای وابسته به بیوفیلم هستند که باعث بیماری و یا حتی مرگ به دلیل آلودگیهای تجهیزات پزشکی نیز می شوند. تشکیل بیوفیلم یک سیکل بیپایان است که منجر به تشکیل اجتماعی از باکتریها می شود که در ماتریکسی از مواد پلیمری خارج سلولی (EPS) قرار دارند. این ماتریکس سلولهای باکتریایی را به شکل چسبیده به یکدیگر و متصل به یک سطح، نگه میدارد. نشان داده شده است که این بیوفیلمهای تشکیل شده، مسئول ۸۰-۶۵٪ از عفونتهای میکروبی هستند(۳, ۵). محققان به دلیل اهمیت بیوفیلم در ایجاد بیماریها و مقاومت دارویی در جستجوی راههای مناسبی برای مهار و پیشگیری از تشکیل بیوفیلم هستند.

زهر زنبورعسل مایعی شفاف، با بویی تیز مانند عسل و طعم بسیار تند میباشد. زهر زنبورعسل دارای پپتیدهای مختلفی از جمله ملیتین، آپامین، آدولاپین، Secapin و پپتید MCD (Mast Cell Degranulation) همچنین از آنزیم هایی مانند فسفولیپاز A2 و هیالورونیداز و Phosphomonoesterase و Lysophospholipase و از آمینهایی مانند هیستامین، دوپامین، نوراپی نفرین و سروتونین و بسیاری مواد دیگر تشکیل شده است(۶). ملیتین ۵۰ تا ۶۰ درصد وزن خشک زهر را شامل میشود(۷)و جزء اصلی زهر زنبورعسل، با اثرات بیولوژیکی مثبت و سمیت کم میباشد. پپتید MCD و همچنین فسفولیپاز A2 سمیترین قطعه زهر میباشند (۸). ملیتین فاقد هر گونه پیوند دیسولفیدی میباشد و دارای یک انتهای N-ترمینال آبگریز و یک C-ترمینال آبدوست و به شدت بازی میباشد. ملیتین پپتیدی با ۲۶ اسیدامینه است (۹). ملیتین باعث ایجاد منافذی در فسفاتیدیل کولین غشاء میشود. توانایی و قابلیت نفوذپذیری غشایی پپتیدهایی مثل ملیتین و سایر پپتیدهای ضدمیکروبی را میتوان از طریق آزاد شدن مولکولهای نشاندار با فلورسنت مثل دکستران، ایمونوگلوبولینها و... نیز اندازهگیری کرد (۱۰).

عفونت زخم سوختگی می تواند با داخل شدن به خون باعث مرگ بیمار شود و با ایجاد التهابات در زخم سوخته مدت زمان ترمیم را افزایش دهد (۱۱). اصلی ترین مشکل در درمان سوختگی، عفونت میباشد. از مهمترین چالشهای درمان عفونت در بیماران سوختگی، افزایش مقاومت آنتیبیوتیکی و ایجاد سوشهای مقاوم به درمان میباشد. لذا خطر مقاومت آنتیبیوتیکی بسیار جدی بوده و باید یک راه حل جدید ارائه گردد. پروتئین های آزاد شده در بافت سوخته و همینطور اختلال در عملکرد سیستم ایمنی که ناشی از آسیب سوختگی می باشد، این موقعیت را به میکرو ارگانیسم های فرصت طلب می دهند که در زخم مستقر شده و آن را عفونی کنند (۱۲).

روش کار

نمونه زهر از شرکت بهپروران شهرکرد خریداری شد. زنبور بوسیله شوک الکتریکی، تحریک شده و سیم زیر خود را نیش می زند. زهر زنبور پس از گزش، خشک شده و با تراشیدن سطح شبکه سیمی جمع آوری شده است (۱۳).

نمونه های استافیلوکوکوس اورئوس در بیمارستان شهید مطهری از بیماران دچار عفونت سوختگی در یک دوره ۱۲ ماهه جمع آوری شد. تعداد نمونه های مورد بررسی ۵۰ عدد بود. باکتری ها بعد از کشت در محیط stock حاوی ۲۰٪ گلیسرول و در داخل ۲۰- نگهداری شد.

برای آماده سازی زهر ابتدا ۲۰ میلی گرم از آن وزن شده و در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل شد و سپس به مدت ۵ دقیقه ورتکس گردید. برای جدا سازی اجزاء تشکیل دهنده زهر زنبور عسل از دستگاه HPLC به روش فاز معکوس (Knauer GmbH, Germany) و با استفاده از ستون C18 به عنوان فاز ساکن و محلول های استونیتریل- تری فلوئورواستیک اسید ۰/۰۵ درصد و آب-تری فلوئورواستیک اسید ۰/۰۵ درصد به عنوان فاز متحرک، استفاده شد. روش تخلیص ملیتین گرادیانت خطی استونیتریل، و طول موج مورد استفاده، ۲۱۴ نانومتر بود. پیک مربوط به ملیتین جمع آوری شده و به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه فریز درایر قرار داده شد تا لیوفیلیزه گردد. برای تعیین غلظت ملیتین از روش BCA استفاده شده که طبق دستورالعمل کیت، OD آن در طول موج ۵۶۲ نانومتر خوانده شده و غلظت نهایی محاسبه گردید. به منظور بررسی خلوص و کیفیت ملیتین به دست آمده از روش الکتروفورز پلی اکریل آمید-سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) با ژل ۱۵ درصد استفاده شد.

جهت تهیه نیم مک فارلند، باکتری را در محیط TSB کشت داده و بعد از سانتریفیوژ رسوب را دریک میلی لیتر TSB سوسپانسیونه شد و سپس مجددا سانتریفیوژ گردید و از رسوب ایجاد شده

سوسپانسیون تمیز تهیه گردید. برای تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) ملیتین، مقدار70 µg در حجم 200 µl به چاهک اول اضافه شده و مقادیر بعدی بصورت رقیق سازی سریالی با ضریب ۱/۲ تهیه شد. پس از رقت سازی، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر باکتری با تعداد ۵×۱۰۵ عدد اضافه گردید و میکروپلیت به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. آخرین چاهک شفاف به عنوان MIC تعیین گردید. جهت تعیین حداقل کشندگی (MBC) ملیتین از چاهک های شفاف ۱۰ میکرولیتر برداشته و در محیط کشت مولر هینتون اگار کشت داده شد و به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت، در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از آن تعداد کلنی های رشد کرده در محیط، شمارش گردید.

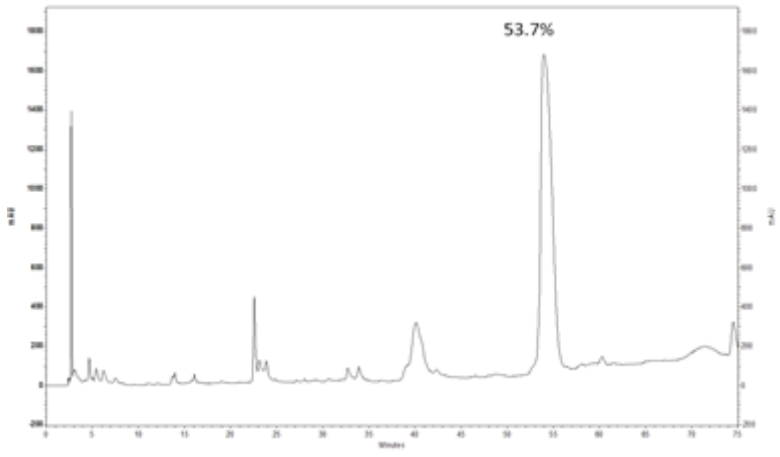
جهت بررسی تولید بیوفیلم در سویه های مورد نظر، در پلیت ۹۶ خانه ای برای هر باکتری سه چاهک در نظر گرفته شد. چاهک اول برای TSB با گلوکز ۰٫۱٪ و بدون باکتری (بعنوان کنترل OD) ، چاهک دوم TSB با گلوکز ۰٫۱ ٪ و سوسپانسیون باکتری و چاهک سوم مربوط به TSB بدون گلوکز و سوسپانسیون باکتری بود. تعداد ۱۰۷ باکتری از هر سویه به میکروپلیت پلیت ۹۶ خانه ای ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. سپس محلول رویی با سمپلر از هر سه چاهک برداشته شد و با سرم فیزیولوژی سه مرتبه چاهک ها شسته شد. سپس به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر متانول ۱۰۰٪ به مدت ۱۵ دقیقه اضافه شد. سپس محلول داخل چاهک دور ریخته شده و به ان ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله یک درصد اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه اینکوبه شد. سپس رنگ را با سمپلر خارج کرده و چندین بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد تا رنگ اضافه شسته شود. پس از خشک شدن چاهک ها، ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ به همه ی چاهک ها اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. در انتهاOD پلیت در طول موج ۵۹۵ نانومتر با اسپکتوفتومتر ثبت شد.

جهت بررسی اثر تخریبی ملیتین بر بیوفیلم سویه ها، طبق روش فوق ابتدا بیوفیلم سویه ها در چاهک های میکروپلیت تشکیل داده شد. سپس مقادیر مختلف ملیتین شامل MIC۱، 1/10MIC و MIC۱۰۰/۱ به چاهک های شسته شده اضافه گردید. بعد از طی زمان ۲ ساعت، طبق روش فوق چاهک ها با آرامی شسته شده و رنگ آمیزی شد. سپس OD نمونه ها خوانده شد. کاهش مقدار OD در چاهک ها نشاندهنده تخریب بیوفیلم بود.

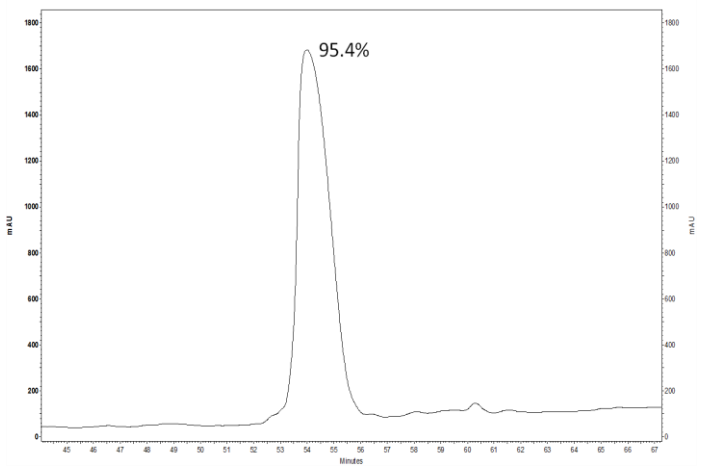
به منظور بررسی اثر کشندگی ملیتین بر باکتری های داخل بیوفیلم، به روش فوق ملیتین به بیوفیلم تشکیل شده اضافه شد. بعد از طی زمان ۲ ساعت، کف چاهک ها با کمک سرسمپلر با روش خراش، خراشیده شده و در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. بعد از زمان ۲۴ ساعت، تعداد کلنی باکتری ها شمارش گردید.

یافته ها

حدود ۲۰ پیک در کروماتوگرام HPLC مشاهده شد. بیشترین سطح زیر منحنی بین فراکشن های موجود، مربوط به ملیتین بود که تقریبا ۶۳/۸٪ از مساحت کل فراکشن ها را به خود اختصاص داده بود (نمودار ۱). در حدود زمان ۵۲ تا ۵۶ دقیقه (معادل با ۴ دقیقه) ملیتین از ستون C18 خارج شد. این محدوده زمان معادل درصد استونیتریل از میزان ۴۷ تا ۵۱ درصد می باشد. برای تعیین خلوص ملیتین خالص شده از نرم افزار ChromGateاستفاده شد که معادل ۹۵/۴ درصد محاسبه بود (نمودار ۲).



نمودار ۱- کروماتوگرام زهر زنبور عسل



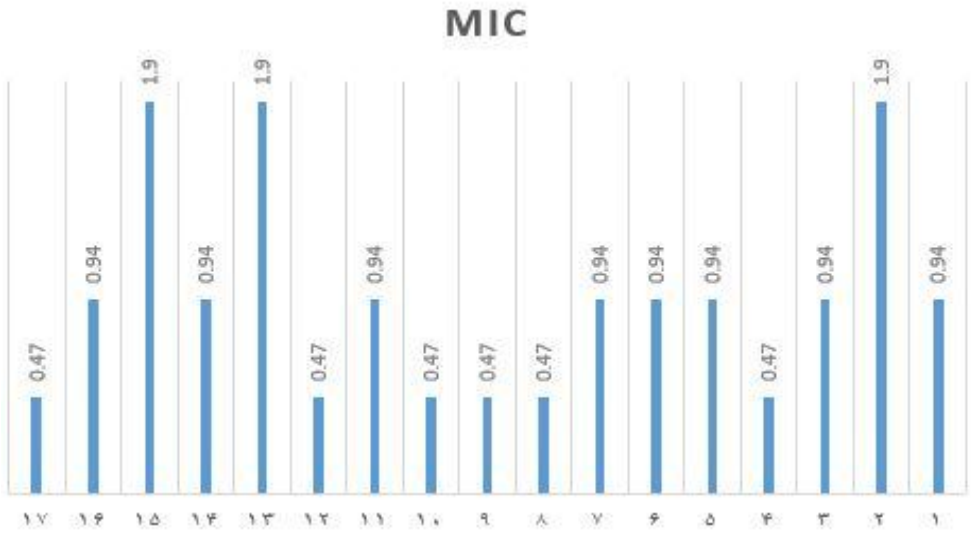
نمودار ۲-کروماتوگرام ملیتین تخلیص شده از زهر زنبور عسل

برای تعیین تولید بیوفیلم تمام سویه ها از روش اسپکتروفوتومتری استفاده شد. نتایج نشان داد که اکثر سویه قادر به تولید بیوفیلم بودند اما مقادیر در سویه ها متفاوت بود. میانگین کل تولید بیوفیلم برابر با ۲/۳۵ بود. با اضافه کردن ملیتین میزان OD کاهش یافت که این نتیجه نشان دهنده ی تخریب بیوفیلم باکتری می باشد.

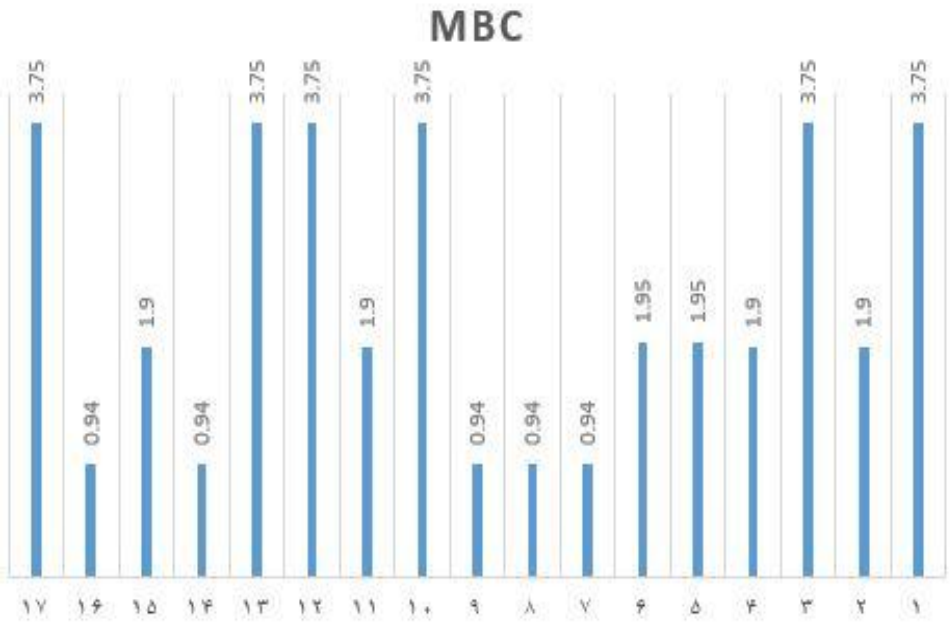
میانگین کل OD در تمام سویه ها در MIC۱ برابر با ۱/۳۹بود (جدول ۱). نتایج تست بررسی اثر کشندگی ملیتین بر باکتری های داخل بیوفیلم نشان داد که تقریبا تمام سویه ها با افزایش مقدار ملیتین از بین می روند(نمودار ۳ و ۴).

جدول ۱.نتایج تست تخریب بیوفیلم سویه‌های بیوفیلم مثبت

سویه ها	تولید بیوفیلم	MIC
۱	۱/۵۶۶	۰/۷۹۸
۲	۳/۹۶۰	۱/۲۵۰
۳	۳/۹۴۵	۰/۶۶۴
۴	۱/۲۲۰	۰/۷۹۴
۵	۳/۵۵۲	۳/۵۹۹
۶	۱/۹۳۲	۱/۰۹۶
۷	۱/۵۹۰	۱/۲۱۳
۸	۱/۵۵۰	۱/۹۱۵
۹	۲/۶۰	۱/۱۴۲
۱۰	۱/۶۸۳	۱/۴۲۸
میانگین	۲/۳۵	1/39



نمودار ۳- MIC سویه‌های بیوفیلم مثبت



نمودار ۴- نتایجMBC سویه‌های بیوفیلم مثبت

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس فلور طبیعی بعضی از انسان‌ها بوده و در قسمت قدامی مجرای بینی به وفور مشاهده می¬شود. استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با استافیلوکوک¬های کواگولاز منفی به واسطه داشتن عوامل ویرولانس بیشتر، از قدرت بیماری¬زایی بیشتری برخوردار است (۱۴). استعداد بالای سویه¬های استافیلوکوکوس اورئوس در کسب ژن¬های مقاومت آنتی-بیوتیکی از سایر باکتری¬ها و درنتیجه افزایش مقاومت¬های آنتی¬بیوتیکی در کنار قدرت بالای بیماری¬زایی و ایجاد بیوفیلم، به یک نگرانی عمده در سلامت بیماران مبدل شده است(۱۵). این مطالعه به منظورارزیابی توانایی باکتری‌ها استافیلو کوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های بالینی برای تشکیل بیوفیلم انجام شد.

در طبیعت باکتریها به دو شکل پلانکتونیک و بیوفیلم یافت میشوند بیوفیلم‌های باکتریایی، تجمعات پیچیده باکتریها هستند که در یک پوشش گلیکوکالیکس محصور شده و به سطوح مخاطی میچسبند. تشکیل بیوفیلم در گونه‌های مختلف باکتریها از جمله استافیلو کوکوس اورئوس مشاهده شده است .تشکیل بیوفیلمهای استافیلو کوکوس اورئوس در راههای هوایی بیماران سیستیک فیبروزیس ، پنومونی همراه با ونتیلاتور و بیماران ریوی مزمن، یکی از عوامل مهم در طولانی شدن دوره درمان ، تشدید علا یم بالینی و حتی مرگ بیماران میباشد. همچنین بیوفیلم در عفونت‌های جسم خارجی مانند دریچه‌ها ی مصنوعی قلب، دندان،کاتتر، مفصل مصنوعی و سوند ادراری مشاهده می شوند .عفونت‌های بیوفیلم حتی در اشخاص سالم با سیستم ایمنی مناسب هم ندرتاً دیده شده و بافت مجاور بیوفیلم به دلیل پاسخ ایمنی دچار تخریب می شوند و تا زمانی که جراحی نشده و یا وسیله خارجی برداشته نشوند، عفونت پابرجا خواهد بود(۱۶).

پپتیدهای ضد میکروبی دارای فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی و ضد ویروسی می توانند بر علیه انواع مختلفی از میکروارگانیسم ها عمل کنند. پپتیدهای ضد میکروبی در التهابات سپتیک و غیر سپتیک، ترمیم زخم، و تنظیم سیستم ایمنی اکتسابی نیز نقش موثر دارند (۱۷). مطالعه Omran Alia و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی اثر ضد باکتری زهر زنبور عسل سوریه ای نشان داد که زهر این زنبور بر باکتری های گرم مثبت اثر زیادی داشته است (۱۸). درمان بیوفیلم هنوز یکی از معضلات مهم در جامعه بشری می باشد. یکی از راه‌های درمانی پیشنهاد استفاده از پپتید ملیتین می باشد.

ملیتین می تواند به مراتب موثرتر از آنتی بیوتیک‌های رایج باشد و چه بسا با توجه به مقاومت‌های روز افزونی که نسبت به انتی بیوتیک‌های مورد استفاده در حال وقوع است، جایگزین بسیار مناسبی بجای انتی بیوتیک‌ها خواهد شد. ملیتین مشکلات جهش را ندارد و هزینه آن نسبت به روش‌های فاژ درمانی مقرون به صرفه تر می باشد. با به کار بردن این روش در بیمارستان‌ها چه بسا استفاده نابجا از انتی بیوتیک‌ها اصلاح شود و درمانی بهتر و کارامدتر اجرا شود. نتایج تست تخریب بیوفیلم با پپتید ملیتین نشان داد که با افزایش دوز پپتید ملیتین تخریب بیشتری صورت می گیرد .این نتایج بسیار امیدوارکننده و حائز اهمیت می باشد. نتایج تست از بین رفتن باکتری ها در داخل بیوفیلم نشان داد که پپتید ملیتین نه تنها باعث تخریب بیوفیلم می شود بلکه می تواند از بیوفیلم عبور کرده استافیلو کوکوس اورئوس را از بین ببرد.

با توجه به اینکه باکتری‌ها داخل بیوفیلم متابولیسم بسیار آهسته ای دارند و تکثیر پیدا نمی کنند، بنابراین اکثر آنتی بیوتیک‌های رایج که قابلیت عبور از بیوفیلم را دارند، نمی توانند باعث از بین رفتن تمام باکتری‌ها داخل بیوفیلم شوند، چون تقریبا اکثر آنتی بیوتیک‌های موجود هنگامی بر باکتری‌ها اثر می گذارند که باکتری متابولیسم نرمالی داشته و در حال تکثیر باشد. بنابراین با توجه به اینکه پپتید ملیتین بر غشای باکتری‌ها اثر نفوذی گذاشته و آنها را از بین می برد میتوان امیدوار بود که در آینده، پپتید ملیتین بعنوان یک آنتی بیوتیک جهت از بین بردن باکتری‌ها داخل بیوفیلم تشکیل شده در سطح زخم سوختگی بکار برده شود. با توجه به نتایج بدست آمده میتوان به اهمیت پپتیدهای آنتی ماکروبیال در نفوذ از بیوفیلم و از کشته شدن باکتری‌ها پی برد.

مقایسه مطالعات مختلف بین المللی با نتایج این تحقیق نشان می دهد که پپتید ملیتین از لحاظ قدرت مهاری و میکروب¬کشی از آنتی بیوتیک های دیگر قوی ¬تر بوده (۱۹, ۲۰) و این موضوع ثابت می¬کند که بررسی بر روی ملیتین ارزش تحقیقی و صنعتی زیادی دارد.

نتیجه گیری

پپتید ملیتین با تکنیک HPLC فاز معکوس با خلوص بالایی تخلیص شد. اکثر سویه‌های کلینیکی استافیلوکوکوس اورئوس تولید کننده بیوفیلم بودند. ملیتین توانست در مدت کوتاهی در عرض ۲ ساعت باعث تخریب بیوفیلم باکتری‌ها گردد. ملیتین در دوز MIC قادر به از بین بردن باکتری‌های داخل بیوفیلم می باشد که این مقدار دوز غیر سمی محسوب می شود.

REFERENCES

1. Lowy FD.
Staphylococcus aureus infections. New England journal of medicine. 1998;339(8):520-32.
2. Moxnes JF, de Blasio BF, Leegaard TM, Moen AEF. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) is increasing in Norway: a time series analysis of reported MRSA and methicillin-sensitive S. aureus cases, 1997–2010. PLoS One. 2013;8(8):e70499.
3. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. The lancet. 2001;358(9276):135-8.
4. Agnihotri N, Gupta V, Joshi R. Aerobic bacterial isolates from burn wound infections and their antibiograms—a five-year study. Burns. 2004;30(3):241-3.
5. Oyama T, Miyazaki M, Yoshimura M, Takata T, Ohjimi H, Jimi S. Biofilm-forming methicillin-resistant Staphylococcus aureus survive in Kupffer cells and exhibit high virulence in mice. Toxins. 2016;8(7):198.
6. Banks BE, Shipolini RA. Chemistry and pharmacology of honey-bee venom. Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, pharmacological and behavioral aspects. 1986:329-416.
7. Pratt JP, Ravnic DJ, Huss HT, Jiang X, Orozco BS, Mentzer SJ. Melittin-induced membrane permeability: a nonosmotic mechanism of cell death. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 2005;41(10):349-55.
8. Robson CH. Bee venom collection apparatus. Google Patents; 1988.
9. Lubke LL, Garon CF. The antimicrobial agent melittin exhibits powerful in vitro inhibitory effects on the Lyme disease spirochete. Clinical infectious diseases. 1997;25(Supplement_1):S48-S51.
10. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nature reviews microbiology. 2005;3(3):238-50.
11. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. Clinical microbiology reviews. 2006;19(2):403-34.
12. Order SE, Mason Jr AD, Switzer WE, Moncrief JA. Arterial vascular occlusion and devitalization of burn wounds. Annals of surgery. 1965;161(4):502.
13. Benton AW, Morse RA, Stewart JD. Venom collection from honey bees. Science. 1963;142(3589):228-30.
14. Rahimi F, Bouzari M, Maleki Z, Rahimi F. Antibiotic susceptibility pattern among Staphylococcus spp. with emphasis on detection of mecA gene in methicillin resistant Staphylococcus aureus isolates. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2009;4(3):143-50.
15. Rahimi F, Karimi S. Characteristics of methicillin resistant staphylococcus aureus strains isolated from poultry in iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2015;10(4).
16. Nakatsuji T, Gallo RL. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. Journal of Investigative Dermatology. 2012;132(3):887-95.
17. Brandenburg L-O, Merres J, Albrecht L-J, Varoga D, Pufe T. Antimicrobial peptides: multifunctional drugs for different applications. Polymers. 2012;4(1):539-60.
18. Leandro LF, Mendes CA, Casemiro LA, Vinholis AH, Cunha WR, Almeida Rd, et al. Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A2 of honey bee (Apis mellifera) venom against oral pathogens. Anais da Academia Brasileira de Ciencias. 2015;87(1):147-55.
19. Vaudaux P, Huggler E, Bernard L, Ferry T, Renzoni A, Lew DP. Underestimation of vancomycin and teicoplanin MICs by broth microdilution leads to underdetection of glycopeptide-intermediate isolates of Staphylococcus aureus. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010;54(9):3861-70.
20. Yeh Y-C, Yeh K-M, Lin T-Y, Chiu S-K, Yang Y-S, Wang Y-C, et al. Impact of vancomycin MIC creep on patients with methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2012;45(3):214-20.