

غیرفعال سازی فتودینامیکی باکتری‌های مقاوم به دارو با رنگ متیلن بلو

خلاصه

مقدمه: با توجه به مصرف فراوان آنتی بیوتیک‌ها گسترش باکتری‌های مقاوم به دارو یکی از تهدیدهای سلامت عمومی جوامع به حساب می‌آید و غیرفعال‌سازی فتودینامیکی می‌تواند راهکار غلبه بر این نقطه‌ضعف باشد. در این مطالعه اثر متیلن‌بلو برانگیخته شده با نور لیزر (۶۶۰ نانومتر) بر روی گونه‌های باکتریایی مقاوم به دارو (*Staphylococcus aureus*، *Staphylococcus epidermidis*، *Escherichia coli*) که از زخم‌های پای دیابتی جدا شده بودند، بررسی گردید. **روش بررسی:** اثر غلظت عامل حساس‌گر نوری (100 ، 50 ، 25) و زمان تابش لیزر (۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه) بر اثر کشندگی غیرفعال‌سازی فتودینامیکی بررسی شد.

یافته‌ها: همه گونه‌ها به غیرفعال‌سازی فتودینامیکی حساس بودند. قابلیت کشندگی به غلظت متیلن‌بلو بستگی نداشت ولی به دوز نور وابسته بود. حساس‌سازی نوری متیلن‌بلو با استفاده از نور قرمز لیزر ($109.2J/cm^2$) قادر به کاهش $993/03$ ، $98/95$ و $92/23$ درصدی در تعداد باکتری‌های زنده *S. aureus*، *S. epidermidis* و *E. coli* (تعداد اولیه باکتری‌ها $10^5 - 10^4$ CFU/ml) بود.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نشان می‌دهد که متیلن بلو در ترکیب با نور قرمز می‌تواند عامل مؤثری برای از بین بردن باکتری‌های مقاوم به دارو در زخم‌های عفونی باشد.

واژه‌های کلیدی: غیرفعال‌سازی فتودینامیکی، باکتری‌های مقاوم به دارو، عفونت‌های زخم.

نسیم کاشف^۱محسن فاتح^۲مریم سیروسی^۳عادلۀ تقی‌خانی^۳فائزۀ حسامی ذکائی^۳غلامرضا اسماعیلی جاوید^۲

استادیار باکتری‌شناسی پزشکی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران
آمربیی پژوهش، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی
بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران

نویسنده مسئول: محسن فاتح، مربی پژوهش، مدیر گروه پژوهشی لیزر پزشکی مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تلفن: ۶۶۴۹۰۸۵۵
پست الکترونیک: fatehmohsen@yahoo.com

مقدمه

افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به ترکیبات ضد میکروبی نیاز به دستیابی به راهکارهای درمانی جدید را برای عفونت‌های موضعی نشان می‌دهد. یکی از این راهکارها فتودینامیک‌تراپی (PDT) است که بر اساس واکنش نور مرئی و یک ترکیب حساس به نور که تحت تأثیر نور، گونه‌های سمی تشکیل می‌دهد پایه‌ریزی شده است [۱]. با فتودینامیک‌تراپی می‌توان میکروارگانیسم‌های حساس به آنتی‌بیوتیک و مقاوم به آن را غیرفعال ساخت [۲-۴]. همچنین تکرار این فرآیند سبب تشکیل سلول‌های مقاوم باکتری نمی‌گردد [۵].

به علت کاربرد آسان رنگ و نور به شکل موضعی، زخم‌های عفونی سطحی قابلیت بالقوه درمان با PDT را دارا می‌باشند. از بین بردن باکتری‌های آلوده‌کننده زخم با استفاده از رنگ‌های حساس به نور در مطالعات مختلفی گزارش شده است [۶-۹]. در مورد کارایی محلول متیلن‌بلو در درمان بافت‌های سرطانی و بیماری‌های غیرسرطانی مطالعات مختلفی صورت گرفته است [۱۰-۱۳]. همچنین فعالیت فتودینامیکی متیلن‌بلو بر باکتری‌های پاتوژن نیز مطرح گردیده است [۱۴ و ۱۵]. متیلن‌بلو به راحتی از دیواره سلولی باکتری‌ها عبور می‌کند

و به علت دارا بودن بار مثبت، به راحتی به بار منفی لیپوپلی ساکارید باکتری‌های گرم‌منفی متصل می‌شود [۱۶]. باکتری‌های گرم‌مثبت نیز که تنها پتیدیوگلیکان را در خارج از غشای سیتوپلاسمی خود دارند، متیلن‌بلو را به راحتی از دیواره خود عبور می‌دهند [۱۷]. با این حال گزارش‌های کمی از تأثیر این رنگ بر باکتری‌های مقاوم به دارو در دست است. در این مطالعه ما حساسیت ارگانیسم‌های مقاوم به دارو را نسبت به فتودینامیک‌تراپی با استفاده از رنگ متیلن بلو و نور لیزر ۶۶۰ نانومتر مورد بررسی قرار داده‌ایم.

روش بررسی

گونه‌های باکتریایی و شرایط محیطی

دو باکتری گرم‌مثبت (*Staphylococcus epidermidis*) و یک باکتری گرم‌منفی (*Staphylococcus aureus*) و یک باکتری گرم‌منفی (*Escherichia coli*) در این مطالعه استفاده شدند. هر سه ارگانیسم از زخم عفونی پای بیماران دیابتی جدا شدند و الگوی حساسیت ضد

تا $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ، چاهک‌ها به مدت ۳۰ دقیقه (زمان قبل از تابش) در تاریکی سپس در معرض نور (91 mW cm^{-2}) قرار گرفتند. در این سیستم ۱۰ دقیقه تابش نور برابر با انرژی $54/6 \text{ J cm}^{-2}$ است.

هر آزمون ۵ مرتبه و در ۴ حالت مختلف انجام شد.

گروه‌های کنترل شامل:

(۱) سوسپانسیون‌های میکروبی که حاوی متیلن‌بلو نبودند و در معرض نور قرار نگرفتند (حساسگر نوری، لیزر، L-S-).

(۲) سوسپانسیون‌های میکروبی که با متیلن‌بلو در تاریکی انکوبه شدند (حساسگر نوری، لیزر، L-S+).

(۳) سوسپانسیون‌های میکروبی که در غیاب متیلن‌بلو در معرض نور قرار گرفتند (حساسگر نوری، لیزر، L+S-).

(۴) گروه آزمایش: سوسپانسیون‌های میکروبی که در حضور متیلن‌بلو در معرض نور قرار گرفتند (حساسگر نوری، لیزر، L+S+).

پلیت‌ها هنگام تابش نور درپوش داشتند تا شرایط استریل حفظ شود. برای شمارش باکتری‌های زنده پس از تهیه رقت‌های سریال بر روی نوترینت آگار کشت داده شد.

تأثیر دوز نور لیزر بر اثر کشندگی فتودینامیک تراپی

تأثیر دوز نور لیزر بر کشتن باکتری‌ها با تغییر زمان تابش و ثابت نگه‌داشتن فاصله منبع نور تا پلیت بررسی گردید. سوسپانسیون میکروبی طبق توضیح پیشین تهیه شد و غلظت نهایی $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ از رنگ برای ادامه کار استفاده شد. بقاء باکتری‌ها بعد از ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه تابش (0.091 W cm^{-2}) برابر با دوز انرژی به ترتیب ۲۷/۳، ۵۴/۶ و $109/2 \text{ J cm}^{-2}$ اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

مقادیر به صورت انحراف معیار \pm میانگین \log_{10} بیان شدند. مقایسه بین میانگین گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون One-Way ANOVA بررسی گردید. مقادیر $P < 0.05$ از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی شد.

یافته‌ها

وقتی *S. aureus* با غلظت‌های مختلف متیلن‌بلو تیمار شد و در معرض $54/6 \text{ J cm}^{-2}$ نور قرمز قرار گرفت، حتی با کمترین غلظت متیلن‌بلو کاهش قابل توجهی در تعداد باکتری‌های اولیه مشاهده گردید. برای مثال وقتی غلظت $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ از متیلن‌بلو استفاده شد، کاهش قابل ملاحظه‌ای ($P < 0.001$) در تعداد باکتری‌های سوسپانسیون اولیه (1.8 CFU ml^{-1}) ($1.8 \text{ CFU ml}^{-1} \times 10^4$) مشاهده گردید ($98/41$ درصد از باکتری‌ها کشته شدند). سوسپانسیون *S. aureus* که با متیلن‌بلو تیمار شده بود اما، در معرض نور قرار نگرفته بود (L-S+) یا سوسپانسیونی که در غیاب متیلن‌بلو تحت تابش نور قرار گرفته بود (L+S-)، کاهش در تعداد باکتری‌های سوسپانسیون اولیه نشان ندادند (شکل ۲).

میکروبی هر کدام با روش استاندارد انتشار دیسک مطابق با توصیه‌های CLSI تعیین شد [۱۸].

S. aureus به ۱۱ آنتی‌بیوتیک مقاوم بود که عبارت بودند از: آموکسی‌سیلین-کلاوولانات ($20/10 \mu\text{g}$)، سفتازیدیم ($30 \mu\text{g}$)، اگزاسیلین ($1 \mu\text{g}$)، پپیراسیلین ($100 \mu\text{g}$)، سفالکسین ($30 \mu\text{g}$)، ایمپنم ($10 \mu\text{g}$)، سیپروفلوکساسین ($5 \mu\text{g}$)، کلیندامایسین ($2 \mu\text{g}$)، اریترومایسین ($15 \mu\text{g}$)، جنتامایسین ($10 \mu\text{g}$) و آمیکاسین ($30 \mu\text{g}$).

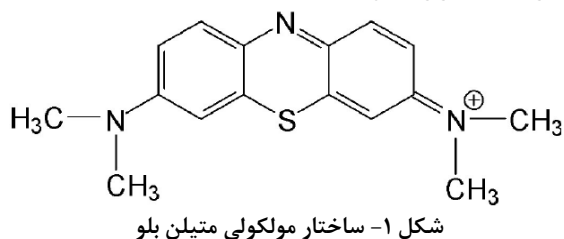
S. epidermidis به سفتازیدیم، اگزاسیلین، پپیراسیلین، اریترومایسین، کوتریموکسازول ($1.25/23.75 \mu\text{g}$)، داکسی‌سایکلین ($30 \mu\text{g}$)، جنتامایسین و آمیکاسین مقاوم بود.

E. coli به آموکسی‌سیلین-کلاوولانات، سفتازیدیم، پپیراسیلین، سفالکسین، ایمپنم، سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین، نورفلوکساسین، کوتریموکسازول، داکسی‌سایکلین و جنتامایسین مقاوم بود.

کشت مجدد ارگانیزم‌ها در هر هفته در نوترینت آگار (Merck) انجام می‌شد. سپس از هرگونه به‌صورت هوازی در پلیت نوترینت آگار در دمای ۳۷ درجه به مدت ۱۸-۲۴ ساعت کشت داده می‌شد و سوسپانسیونی در بافر فسفات استریل (PBS) ($\text{pH}=7/4$) با غلظت $10^5-10^4 \text{ CFU ml}^{-1}$ تهیه می‌شد.

حساسگر نوری و منبع نور

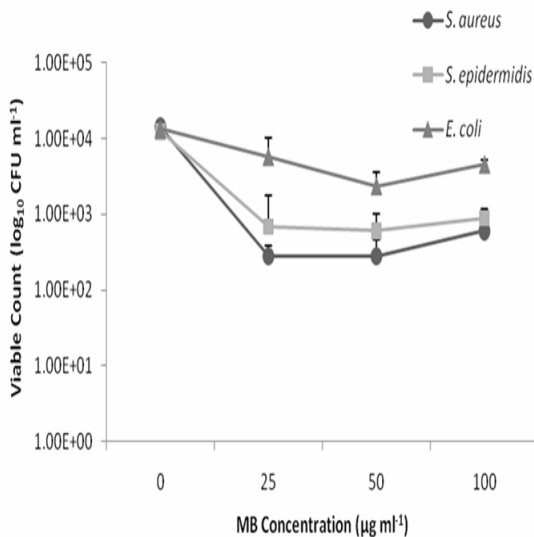
متیلن‌بلو (MB) از Sigma, UK خریداری شد (شکل ۱). محلول متیلن‌بلو برای هر آزمایش در بافر فسفات استریل ($\text{pH}=7,4$) به‌صورت تازه با فیلتراسیون استریل آماده و در تاریکی نگهداری می‌شد. برای تابش از یک لیزر دیود 35 mW (Lasotronic -UK) که نوری با طول موج ۶۶۰ نانومتر ساطع می‌کند، استفاده شد. فاصله دستگاه لیزر و سطح پلیت به‌گونه‌ای تنظیم گردید که میزان تابش 91 mW cm^{-2} باشد.



تأثیر غلظت حساسگر نوری بر اثر کشندگی فتودینامیک تراپی میزان $0/1$ میلی‌لیتر از سوسپانسیون *S. aureus* و *S. epidermidis* (حاوی 10^5-10^4) در بافر استریل به پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد و به همان میزان محلول متیلن‌بلو به آن اضافه شد تا غلظت نهایی رنگ در چاهک‌ها ۱۰۰-۲۵ $\mu\text{g ml}^{-1}$ باشد. بعد از افزودن متیلن‌بلو با غلظت‌های $25 \mu\text{g ml}^{-1}$

تأثیر غلظت‌های مختلف رنگ

اثر کشندگی فرآیند در هیچ‌کدام از گونه‌ها به غلظت متیلن بلو بستگی نداشت. شکل ۳، کاهش تعداد هر سه‌گونه باکتری را با تیمار با غلظت‌های مختلف متیلن بلو و تابش نور با دوز 54.6 J cm^{-2} و چگالی انرژی 0.91 W cm^{-2} نشان می‌دهد.



شکل ۳- اثر کشنده حساس سازی نوری ارگانسیم‌ها با غلظت‌های $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ و 50 و 25 متیلن بلو. میزان مساوی از غلظت مناسب متیلن بلو (L+S+) به هریک از سوسپانسیون‌های باکتریایی اضافه گردید، نمونه‌ها برای مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شدند، سپس در معرض تابش نور قرمز (660 نانومتر) با چگالی انرژی 0.91 W cm^{-2} و دوز 54.6 J cm^{-2} قرار گرفتند.

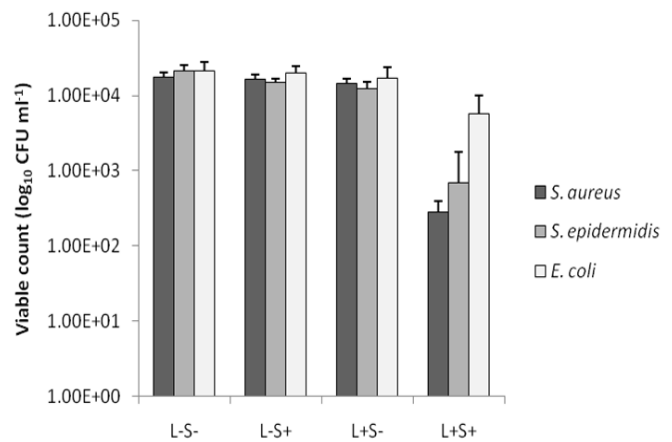
اثر دوز نور

اثر باکتری‌کشی حساس سازی نوری ارگانسیم‌ها وابسته به دوز نور بود (شکل ۴). تابش سوسپانسیون *S. aureus* برای مدت زمان ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه سبب کاهش ($P < 0.001$) به ترتیب $91/25$ ، $99/03$ و $99/03$ درصدی در تعداد باکتری‌های زنده شد.

در مورد *S. epidermidis* تابش نور به مدت ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه سبب کاهش ($P < 0.001$) به ترتیب $87/79$ ، $96/86$ و $98/95$ درصدی باکتری‌های زنده شد. در مورد *E. coli* کاهش معنی‌دار ($P < 0.001$) $71/02$ ، $79/15$ و $92/23$ درصدی در تعداد باکتری‌های زنده با تابش نور به مدت ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه مشاهده شد.

وقتی *S. epidermidis* با غلظت‌های مختلف متیلن بلو تیمار شد و در معرض 54.6 J cm^{-2} نور قرمز قرار گرفت، حتی با کمترین غلظت متیلن بلو کاهش قابل توجهی در تعداد باکتری‌های اولیه مشاهده شد. تیمار با $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ متیلن بلو کاهش تقریبی $96/83$ درصدی ($P < 0.001$) در تعداد باکتری‌های اولیه را نشان داد که این مقدار برابر با کشته شدن $2/08 \times 10^4 \text{ CFU ml}^{-1}$ بود. باکتری‌هایی که با متیلن بلو تیمار شده بودند اما، در معرض نور قرار نگرفته بودند (L-S+) یا آن‌ها که در غیاب متیلن بلو تحت تابش نور قرار گرفته بودند (L+S-)، کاهش معنی‌داری در تعداد باکتری‌های اولیه نشان ندادند (شکل ۲).

وقتی *E. coli* با غلظت‌های مختلف متیلن بلو تیمار شد و در معرض 54.6 J cm^{-2} نور قرمز قرار گرفت، حتی با کمترین غلظت متیلن بلو کاهش قابل توجهی در تعداد باکتری‌های اولیه مشاهده شد، البته این کاهش به بزرگی آنچه در باکتری‌های گرم‌مثبت مشاهده شده، نبود. برای مثال وقتی غلظت $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ از متیلن بلو استفاده شد، کاهش قابل ملاحظه‌ای ($P = 0.23$) در تعداد باکتری‌های سوسپانسیون اولیه مشاهده شد که این مقدار برابر با کشته شدن $7/84 \times 10^3 \text{ CFU ml}^{-1}$ بود و کارایی $57/65$ درصدی را نشان می‌دهد (شکل ۲).



شکل ۲- اثر کشنده حساس سازی نوری ارگانسیم‌ها با غلظت $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ متیلن بلو. میزان مساوی از $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ متیلن بلو (L-S+, L+S+) یا بافر PBS (L-S-, L+S-) به هر سوسپانسیون میکروبی اضافه شد، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شدند، سپس در معرض تابش نور قرمز (660 نانومتر) با چگالی انرژی 0.91 W cm^{-2} و دوز نور 54.6 J cm^{-2} قرار گرفتند (L+S-, L+S+) یا در تاریکی باقی ماندند (L-S+, L-S-).

۵۴/۶ به کاهش معنی‌دار ۹۹/۰۳ درصدی در تعداد باکتری‌های زنده دست یافتیم. در مطالعه دیگر، Orenstein و همکاران با استفاده از مخلوطی از deuteroporphyrin و hemin توانستند با موفقیت زخم‌های سوختگی را که با *S. aureus* آلوده شده بودند، در تاریکی و بدون پرتودهی ضد عفونی کنند [۸] ولی در مطالعه‌ای که ما انجام دادیم، متیلن‌بلو در تاریکی هیچ اثر سمی بر روی ارگانسیم‌های مورد بررسی نداشت. طبق گزارش Peloi و همکاران میزان رشد *S. aureus* و *E. coli* با افزایش غلظت متیلن‌بلو کاهش پیدا می‌کند ($14-70 \mu\text{M}$ و $35-140 \mu\text{M}$) [۱]. هرچند در مطالعه‌ای که ما انجام دادیم اثر باکتری‌کشی در تمام گونه‌های مورد بررسی وابسته به غلظت متیلن‌بلو نبود. به نظر می‌رسد که واکنش غیرفعال‌سازی نوری القاء شده توسط متیلن‌بلوی برانگیخته با افزایش غلظت متیلن‌بلو از ۲۵ به $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($268-67 \mu\text{M}$) افزایش پیدا نمی‌کند.

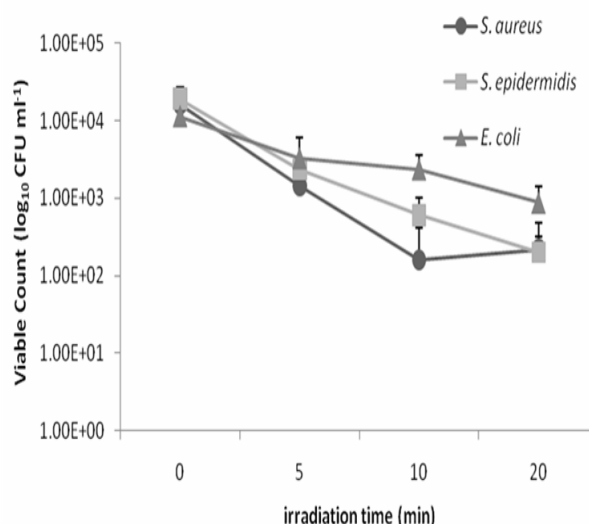
نور لیزر به‌تنهایی قادر به اثر باکتری‌کشی نبود. اگرچه نتایج مطالعه Omar و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که پرتودهی *P. aeruginosa* با دوز نوری 411 J cm^{-2} و طول موج ۸۰۸ نانومتر و چگالی انرژی $1/37 \text{ W cm}^{-2}$ اثر مهاری معنی‌داری بر روی رشد باکتری‌ها دارد [۲۱]. در مطالعه حاضر اثر کشندگی حساس‌گر نوری وابسته به زمان تابش لیزر بود. این یافته را سایر مطالعات نیز تأیید می‌کنند [۱ و ۲۱].

اطلاعات به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که اثر کشندگی معنی‌داری در مورد *S. aureus* و *S. epidermidis* با استفاده از غلظت کم متیلن‌بلو ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$) و دوز نوری $54/6 \text{ J cm}^{-2}$ مشاهده شد. ارگانسیم گرم‌منفی *E. coli* حساسیت کمتری نشان داد زیرا که دوز نوری بالاتری برای کشتن باکتری‌ها لازم بود.

نتایج مطالعه حاضر پیشنهاد می‌کند که متیلن‌بلو در ترکیب با نور قرمز یک انتخاب مناسب برای غیرفعال‌سازی نوری باکتری‌های مقاوم به داروی جداشده از عفونت‌های زخم است. استفاده از این روش سبب کاهش نیاز به آنتی‌بیوتیک‌های سیستمیک برای کنترل عفونت‌های پوستی شده و موجب کاهش ظهور مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی می‌شود. اگرچه نتایج به‌دست آمده در آزمایشگاه امیدبخش است، مطالعات بالینی جهت تعیین کارایی این روش در کشتن باکتری‌ها در زخم لازم است.

تشکر و قدردانی

با تشکر از حمایت‌های دانشگاه تهران و مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران.



شکل ۴- اثر کشنده حساس‌سازی نوری ارگانسیم‌ها با غلظت $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ از متیلن‌بلو. حجم مساوی از غلظت $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ متیلن‌بلو ($L+S+$ و $L-S+$) یا PBS ($L+S-$ و $L-S-$) به تمام سوسپانسیون‌های باکتریایی اضافه شد. نمونه‌ها برای مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند و سپس نمونه‌های ($L+S-$ و $L+S+$) با نور لیزر قرمز (660 نانومتر) با چگالی انرژی $1/091 \text{ W cm}^{-2}$ ، برای مدت ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه و دوز نوری به‌ترتیب $27/3$ ، $54/6$ و $109/2 \text{ J cm}^{-2}$ تحت تابش قرار گرفتند. نمونه‌های $L-S+$ و $L-S-$ در تاریکی نگه داشته شدند.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه کارایی غیرفعال‌سازی نوری باکتری‌های مقاوم به دارو *S. aureus*، *S. epidermidis* و *E. coli* با استفاده از متیلن‌بلو به‌عنوان عامل حساس‌گر نوری و پرتودهی توسط نور قرمز بررسی شدند. متیلن‌بلو به‌عنوان یک عامل حساس‌گر نوری مؤثر در مورد این ارگانسیم‌های آلوده‌کننده زخم شناخته شد. هر چند که کاهش تعداد باکتری‌های *E. coli* به‌اندازه‌ای که در ارگانسیم‌های گرم‌مثبت دیده شد، نبود.

تفاوت حساسیت ارگانسیم‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی به اثر کشنده حساس‌سازی نوری در این مطالعه به‌دلیل تفاوت در ساختار دیواره آن‌ها می‌باشد. باکتری‌های گرم‌منفی دارای غشای خارجی هستند که سبب کاهش جذب گونه‌های فعال اکسیژن توسط باکتری‌ها می‌شود ولی باکتری‌های گرم‌مثبت دارای پپتیدوگلیکان متخلخلی هستند که موجب نفوذپذیری بیشتر می‌شود [۱۹].

Lambrechts و همکاران در سال ۲۰۰۵ با استفاده از پورفیرین کلراید با غلظت $1/56 \mu\text{M}$ و نور 635 نانومتر با دوز $0/6 \text{ J cm}^{-2}$ و $1/5$ توانستند به کاهش $3/6$ و $4/8 \log_{10}$ از تعداد باکتری‌های *S. aureus* دست یابند [۲۰]. ما با استفاده از غلظت $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ از متیلن‌بلو و لیزری با نور قرمز (660 نانومتر) با دوز نوری $109/2 \text{ J cm}^{-2}$

References

1. Pelloi LS, Soares RR, Biondo CE, Souza VR, Hioka N, Kimura E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *J Biosci* 2008; 33(2): 231-7.
2. Ashkenazi H, Nitzan Y, Gal D. Photodynamic effects of antioxidant substituted porphyrin photosensitizers on gram-positive and -negative bacterial. *Photochem Photobiol* 2003; 77(2): 186-91.
3. Soncin M, Fabris C, Busetti A, Dei D, Nistri D, Roncucci G, Jori G. Approaches to selectivity in the Zn(II)-phthalocyanine-photosensitized inactivation of wild-type and antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *Photochem Photobiol Sci* 2002; 1(10): 815-9.
4. Wainwright M, Phoenix DA, Laycock SL, Wareing DR, Wright PA. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 160(2): 177-81.
5. Lauro FM, Pretto P, Covolo L, Jori G, Bertoloni G. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene-polylysine conjugates. *Photochem Photobiol Sci* 2002; 1(7): 468-70.
6. Bisland SK, Chien C, Wilson BC, Burch S. Pre-clinical in vitro and in vivo studies to examine the potential use of photodynamic therapy in the treatment of osteomyelitis. *Photochem Photobiol Sci* 2006; 5(1): 31-8.
7. Hope CK, Wilson M. Induction of lethal photosensitization in biofilms using a confocal scanning laser as the excitation source. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57(6): 1227-30.
8. Orenstein A, Klein D, Kopolovic J, Winkler E, Malik Z, Keller N, Nitzan Y. The use of porphyrins for eradication of *Staphylococcus aureus* in burn wound infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997; 19(4): 307-14.
9. Reszka KJ, Denning GM, Britigan BE. Photosensitized oxidation and inactivation of pyocyanin, a virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Photochem Photobiol* 2006; 82(2): 466-73.
10. Baran R, Gupta AK, Pierard GE. Pharmacotherapy of onychomycosis. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6(4): 609-24.
11. Kalka K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42(3): 389-413.
12. Kamp H, Tietz HJ, Lutz M, Piazena H, Sowyrda P, Lademann J, Blume-Peytavi U. Antifungal effect of 5-aminolevulinic acid PDT in *Trichophyton rubrum*. *Mycoses* 2005; 48(2): 101-7.
13. Tardivo JP, Del Giglio A, Paschoal LH, Ito AS, Baptista MS. Treatment of melanoma lesions using methylene blue and RL50 light source. *Photodiagn Photodyn Ther* 2004; 1: 345-6.
14. Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2004; 17(3): 245-54.
15. Wainwright M, Phoenix DA, Gaskell M, Marshall B. Photobactericidal activity of methylene blue derivatives against vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44(6): 823-5.
16. Livermore DM. Antibiotic uptake and transport by bacteria. *Scand J Infect Dis Suppl* 1990; 74: 15-22.
17. Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol* 2001; 144(2): 274-8.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard, ninth edition. CLSI document M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
19. Jori G, Brown SB. Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem Photobiol Sci* 2004; 3(5): 403-5.
20. Lambrechts SA, Demidova TN, Aalders MC, Hasan T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice. *Photochem Photobiol Sci* 2005; 4(7): 503-9.
21. Omar GS, Wilson M, Nair SP. Lethal photosensitization of wound-associated microbes using indocyanine green and near-infrared light. *BMC Microbiol* 2008; 8: 111.