فعالیت پپتید ضد میکروبی ملیتین تخلیص شده از زهر زنبور عسل به روش HPLC فاز معکوس بر سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران دچار عفونت سوختگی

پروانه بوالیان[۱]، کامران پوشنگ باقری*[۲]

۱ - گروه میکروبیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول های درمانی، انستیتو پاستور 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: دی نود و چهار پذیرش برای چاپ: فروردین نود و پنج

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل مهم در ایجاد عفونت های سوختگی بشمار می رود. امروزه مقاومت به آنتی بیوتیک ها به دلیل جهش های ژنتیکی، در حال افزایش می باشد. هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر آنتی باکتریال پپتید ملیتین جدا شده از زهر زنبور عسل ایرانی بر سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت سوختگی انسان در شرایط in vitro بود.*

روش کار: *در این مطالعه ۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران دچار عفونت سوختگی از مرکز آموزشی درمانی شهید مطهری تهران، در طی ۸ ماه جمع آوری گردید. ملیتین با روش گرادیانت خطی توسط دستگاه HPLC فاز معکوس از زهر زنبور عسل استخراج گردید. MIC و MBC ملیتین و ونکومایسین با استفاده از روش Microdilution Broth با رعایت اصول CLSI تعیین شد.*

یافته ها: *حدود ۲۲ پیک در کروماتوگرام زهر قابل تشخیص بود. سطح زیر منحنی مربوط به ملیتین تقریبا ۶۸/۹٪ از مساحت کل فراکشن ها را تشکیل داده بود. طبق نتایج الکتروفورز، وزن مولکولی ملیتین حدود ۲/۸ کیلودالتون برآورد گردید. MIC50 ، MIC90، MBC50 و MBC90 همچنین نسبت MIC/MBC ملیتین به ترتیب ۱/۱، ۴/۳۵، ۱/۱ و ۸/۷، ۰/۸۶ میکروگرم بدست آمد. MIC50 ، MIC90، MBC50 و MBC90 همچنین نسبت MIC/MBC ونکومایسین به ترتیب ۱، ۱۶، ۳ و ۱۶، ۰/۷ میکروگرم بدست آمد.*

نتیجه گیری: *رشد تمام سویه های بیمارستانی استافیلوکوکوس اورئوس توسط ملیتین مهار گردید. با توجه به نتایج بدست آمده مشخص شد که قدرت مهاری و کشندگی ملیتین دو برابر ونکومایسین می باشد. نسبت MIC/MBC مناسب ملیتین، نشان داد که این پپتید در صورت تبدیل شدن یه یک آنتی بیوتیک، شاخص استاندارد لازم را دارا می باشد. با توجه به اثر ضد باکتری ملیتین در مقدار بسیار کم، در صورت کاربردی شدن آن در آینده، عوارض جانبی کمی خواهد داشت. با توجه به اثر قدرتمند ملیتین، ممکن است مدت زمان درمان نیز کاهش یافته و متعاقب آن، هزینه های درمانی نیز کاهش یابد.*

واژگان کلیدی: عفونت سوختگی، استافیلوکوکوس اورئوس، ملیتین، ونکومایسین

مقدمه

عفونت زخم سوختگی می تواند با ایجاد سپتی سمی باعث مرگ بیمار شود و نیز با ایجاد التهابات در زخم سوختگی مدت زمان بهبودی را افزایش دهد(۱). پروتئین های آزاد شده در بافت سوخته و اختلال در عملکرد سیستم ایمنی ناشی از آسیب سوختگی این امکان را به میکرو ارگانیسم های فرصت طلب می دهند که در زخم استقرار یافته و آن را عفونی کنند(۲).

از پاتوژن های عامل عفونت سوختگی می توان به استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و آسینتوباکتر بومانی، قارچ کاندیدا آلبیکنس و ویروس های CMV، HSV، و Varicella اشاره کرد (۳).

سویه های استافیلوکوکوس اورئوس توانایی زیادی در کسب ژن های مقاومت دارند که این ویژگی در کنار قدرت بیماری زایی زیاد و توانایی تشکیل بیوفیلم، این باکتری را عاملی مهم در تهدید سلامت بیماران دچار سوختگی درجه سه کرده است(۵, ۴).

مقاومت به متی سیلین، گلیکوپپتید ها و اگزازولیدینون ها که در دهه اخیر در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شده اند، می تواند درمان عفونت زخم سوختگی حاصل از این باکتری را

پیچیده تر کند(۶ , ۱). ونکومایسین به تنهایی یا در ترکیب با دارو های دیگر به عنوان یک درمان عمومی در مبتلایان به عفونت های حاصل از استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی سیلین (MRSA) استفاده می شود. اگرچه ونکومایسین آخرین راه حل در درمان این عفونت ها است، با این وجود گزارشاتی مبنی بر وجود مقامت نسبت به این آنتی بیوتیک در سال های اخیر مشاهده شده است که نشان می دهد خطر گسترش مقاومت نسبت به ونکومایسین وجود دارد(۷).

با توجه به مقاومت روز افزون باکتری ها به آنتی بیوتیک ها، پپتید های آنتی میکروبیال با توجه طیف گسترده عمل و سریع الاثر بودن، کاندیدای مناسبی جهت درمان عفونت های حاصل از باکتری های مقاوم می باشند. این پپتید ها از میکروارگانیسم های تک سلولی، حشرات و سایر بی مهرگان، گیاهان، دوزیستان، پرندگان، ماهی ها، باکتری ها، و پستانداران از جمله انسان جدا شده اند. پپتید های ضد میکروبی معمولا کوتاه بین ۱۲ الی ۱۰۰ اسید آمینه بوده، دارای بار مثبت یا منفی و آمفی فیلیک هستند(۸). پپتید های ضد میکروبی از لحاظ نوع ساختار می توانند به سه گروه پپتید هایی با ساختار آلفا هلیکس، پپتید های با ساختار صفحات بتا که به وسیله پل های دی سولفیدی پایدار شده اند و یا پپتید هایی با ساختارهای گسترده یا حلقوی شکل تقسیم شوند(۹).

زهر زنبور(Bee Venom) بطور گسترده در تحقیقات جهت درمان برخی بیماری ها از جمله آرتریت روماتوئید، مولتیپل اسکلروزیس در طب سنتی شرق کاربرد داشته است(۱۰). یکی از ترکیبات زهر زنبور عسل (*Apis mellifera*)، پپتید ملیتین است که حدود ۵۰ درصد وزن خشک زهر را شامل می شود(۱۱). ملیتین پپتیدی کاتیونیک و آمفی پاتیک دارای ۲۶ اسیدآمینه است که ۲۱ اسیدآمینه ابتدای این پپتید بطور عمده آب گریز بوده در حالیکه اسیدآمینه‌های انتهای کربوکسیل آن (اسید آمینه ۲۰ تا ۲۶) آب دوست با بار الکتریکی مثبت می‌باشند. این ساختمان دوگانه به ملیتین امکان واکنش با غشای فسفولیپیدی و تخریب آن ها را می دهد(۱۲).

Lubke و Claude در سال ۱۹۹۷ اثر ملیتین را روی بورلیا بورگدورفری عامل بیماری لایم در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند و دریافتند که ملیتین علاوه بر قدرت مهاری، سطح غشای این اسپیروکت را هم دچار تغییر می کند(۱۳). Brogden در سال ۲۰۰۵ متوجه شد پپتید های ضد میکروبی غشاء سلولی و فرآیند های غشایی را بر هم می‌زنند(۱۴). Leandro و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر زهر زنبور عسل و پپتید ملیتین و فسفولیپاز A_2 را روی باکتری های مولد پوسیدگی دندان بررسی کردند و نشان دادند که زهر زنبور و ملیتین اثر کشندگی بسیار خوبی روی پاتوژن های دهان دارند(۱۵).

با توجه به اهمیت روز افزون مطالعه بر روی پپتید های آنتی باکتریال، این مطالعه با هدف تعیین اثر آنتی باکتریال پپتید ملیتین جدا شده از زهر زنبور عسل ایرانی بر سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از عفونت سوختگی در شرایط in vitro انجام شد.

روش کار

نمونه ها طی یک دوره زمانی ۸ ماهه از مرکز آموزشی درمانی شهید مطهری تهران تحویل گرفته شدند سپس جهت نگهداری در محیط Stock (BHI Broth حاوی ۲۰٪ گلیسرول) و در داخل فریزر ۲۰ – قرار گرفتند. تعداد نمونه ها بر اساس فرمول حجم کوکران ۵۰ عدد بدست آمد. با توجه به اینکه تشخیص سویه ها در بیمارستان شهید مطهری یکبار انجام گرفته بود، لذا فقط جهت اطمینان از تشخیص گونه (اورئوس) رنگ آمیزی گرم و تست کوآگولاز انجام شد.

زهر زنبور توسط یک شرکت از منطقه خرمدره استان زنجان، استحصال شده و خریداری شد. به طور خلاصه، 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 گردید(۱۶). ۲۰ میلی گرم از زهر با ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر به مدت ده دقیقه بوسیله دستگاه ورتکس، مخلوط گردید. سپس محلول رویی فیلتر شده و جهت انجام مرحله تخلیص در دمای$-۲۰^{\circ}C$ نگهداری شد. جدا سازی اجزاء تشکیل دهنده زهر زنبور عسل بوسیله دستگاه HPLC فاز معکوس (Knauer GmbH, Germany) و با استفاده از ستون C_{18} 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، با روش گرادیانت خطی انجام پذیرفت. بعد از تزریق نمونه زهر، گرادینت استونیتریل در مدت ۶۰ دقیقه به ۶۰٪ رسیده و سپس در مدت ۵ دقیقه به ۹۰٪ افزایش یافت. سرعت جریان در تمام مراحل یک میلی لیتر در دقیقه بوده و جهت مشاهده پیک های بدست آمده از طول موج ۲۱۴ و ۲۸۰ نانومتر استفاده گردید. پیک های مشاهده شده، جمع آوری و جهت نگهداری، لیوفیلیزه گردید.

غلظت ملیتین به روش بیسینکونینیک اسید (BCA) طبق دستورالعمل کیت (شرکت Intronbio کره جنوبی) تعیین گردید. جهت تعیین غلظت، OD نمونه در طول موج۵۶۲ نانومتر با دستگاه میکروپلیت اسپکتروفتومتر (Micro plate spectrophotometer Epoch, Biotek instrument, U.S.A) خوانش گردید. غلظت نهایی با استفاده از فرمول خط بدست آمده از نمودار استاندارد BSA محاسبه گردید.

جهت بررسی خلوص و کیفیت ملیتین استخراج شده از زهر زنبور، الکتروفورز پلی اکریل آمید-سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) با ژل ۱۵٪ انجام گردید.

جهت تهیه نیم مک فارلند، باکتری را در محیط مولر هینتون براث (MHB) کشت داده و بعد از سانتریفیوژ رسوب را در یک میلی لیتر MHB سوسپانسیونه کرده و سپس مجددا سانتریفیوژ کرده و از رسوب تمیز سوسپانسیون تمیز تهیه می کنیم. اسپکتروفوتومتر را

برای تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) ملیتین، مقدار µg ۶۹/۵ در حجم µl ۲۰۰به چاهک اول اضافه شده و مقادیر بعدی بصورت رقیق سازی سریالی با ضریب ۱/۲ تهیه شدند. پس از رقت سازی به هر چاهک ۱۰۰میکرولیتر باکتری با تعداد $۱/۵\times۱۰^{۵}$ 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. MIC ونکومایسین به عنوان کنترل با همین روش تعیین گردید.

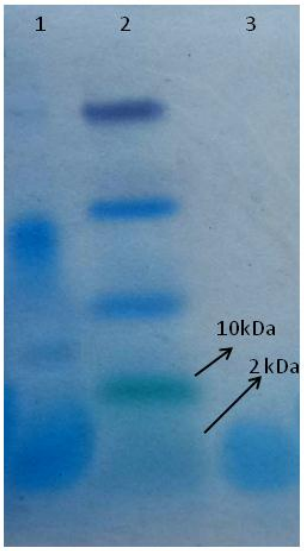
جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) ملیتین از چاهک های شفاف ۲۰ میکرولیتر برداشته و در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت، در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از آن تعداد کلنی های رشد کرده در محیط شمارش شد. جهت تعیین MBC ونکومایسین نیز از همین روش استفاده شد. مقادیر MIC50، MBC50، MIC50/MBC50، و MIC90/MBC90

در طول موج ۶۲۵ نانومتر تنظیم کرده و با محیط MHB بلانک می کنیم. با اضافه کردن مقدار کافی از سوسپانسیون غلیظ به کووت حاوی MHB ، OD سوسپانسیون را در میزان جذب ۰/۰۹ تنظیم گردید. OD نیم مک فارلند در محدوده ی بین ۰/۰۸ الی ۰/۱ معادل با $۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml می باشد. جهت افزایش دقت تعیین تعداد باکتری ها، OD سوسپانسیون برابر با ۰/۰۹ در نظر گرفته شد.

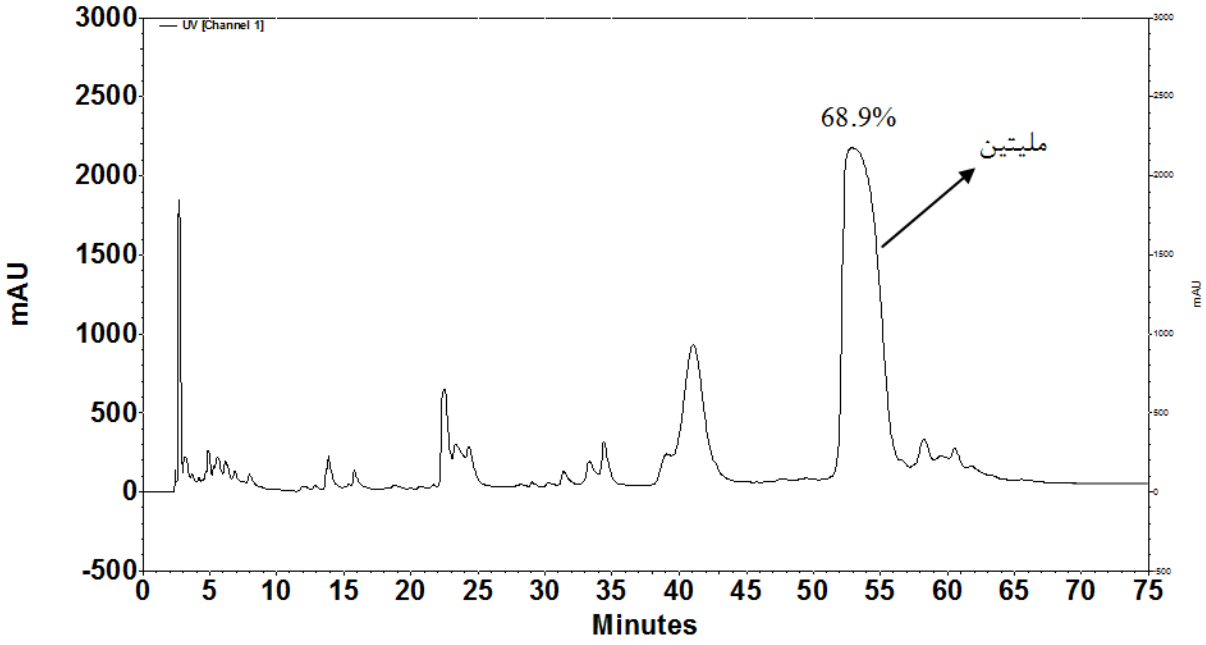
جهت ملیتین و ونکومایسین با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ با محاسبه frequency percentile بدست آمد.

یافته ها

الکتروفورز زهر زنبور، وجود باند های پپتیدی و پروتئینی را نشان داد و همچنین مشخص شد که پپتید ملیتین با غلظت مناسبی در زهر زنبور مورد آزمایش وجود دارد(شکل ۱). حدود ۲۲ پیک در کروماتوگرام زهر قابل تشخیص بود. بیشترین سطح زیر منحنی بین فراکشن های موجود، مربوط به ملیتین بود که تقریبا ۶۸/۹٪ از مساحت کل فراکشن ها را تشکیل داده بود. با توجه به متد اعمال شده در RP-HPLC ، مشخص شد که ملیتین حدودا در ۴۷ درصد استونیتریل از ستون C_{18} خارج شد (نمودار۱). غلظت ملیتین تخلیص شده، برابر با µl/ml ۲۸/۲۵ بدست آمد. قوی‌ترین باند مشاهده شده در الکتروفورز با وزن مولکولی ۲/۸ کیلودالتون مربوط به ملیتین بود(شکل ۱).



شکل۱: الکتروفورز زهر زنبور عسل و ملیتین به روش SDS-PAGE . تعیین وزن ملیتین خالص با استفاده از مارکر Thermo Fisher و مقایسه آن با ملیتین موجود در زهر زنبور عسل. (به ترتیب از چپ به راست) چاهک اول: زهر زنبور، دوم: مارکر، سوم: ملیتین خالص شده

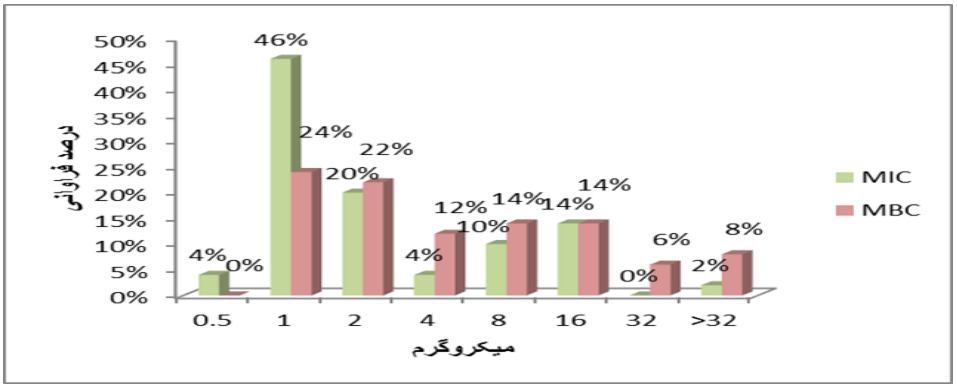


نمودار ۱- کروماتوگرام زهر زنبور عسل به روش HPLC فاز معکوس در طول موج ۲۱۴ نانومتر. بیشترین سطح زیر منحنی در کروماتوگرام زهر زنبور مربوط به ملیتین بود که در غلظت ۴۷٪ استونیتریل از ستون خارج شد.

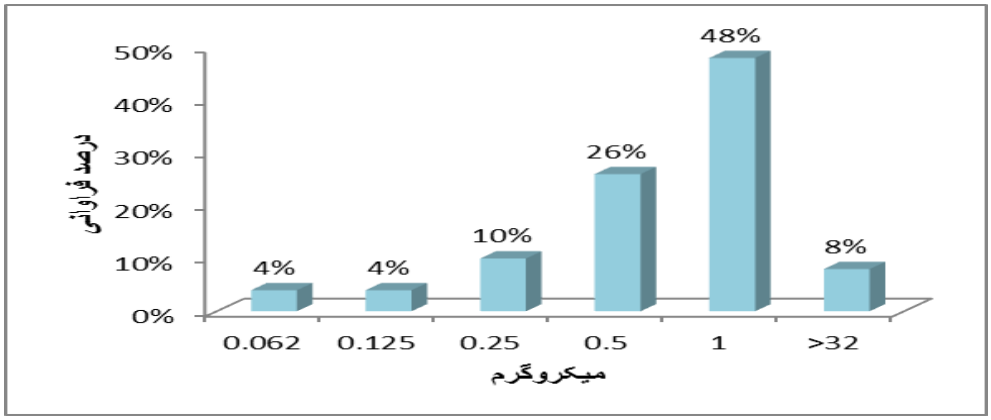
با توجه به مقادیر MIC و MBC مشخص شد که اکثر سویه ها در مقدار بسیار کمی ملیتین از بین رفتند. مقدار بسیار کم ملیتین(۰/۵۵ میکروگرم) توانست رشد ۴۲ درصد از سویه ها را مهار کرده و ۳۴ درصد از آن ها را از بین ببرد (نمودار ۱). در ۷۶٪ جمعیت باکتری مورد مطالعه نسبت MIC/MBC، عدد یک بود(نمودار ۲).

نمودار ۲: درصد توزیع فراوانی MIC و MBC ملیتین(تمایل اکثریت داده ها به سمت چپ بیانگر اثر آنتی باکتریال ملیتین در مقادیر بسیار کم است).

مقادیر MIC، MBC و نسبت MIC/MBC برای ملیتین به ترتیب ۱/۸۹ ، ۳/۲۶ و ۰/۸۶ میکروگرم و برای ونکومایسین برابر ۴/۱۶، ۷، و ۰/۶۹ میکروگرم بدست آمد. مقادیر MIC50 ، MBC50 ، MIC50/MBC50 ، MIC90/MBC90 ملیتین به ترتیب برابر با ۱/۱، ۱/۱، ۱ و ۰/۵ میکروگرم و برای ونکومایسین برابر ۱، ۳، ۰/۳۳ و ۱ میکروگرم بود. ۴۶درصد از سویه ها در مقدار یک میکروگرم از ونکومایسین رشدشان مهار شده و ۲۴درصد از باکتری ها در همین مقدار ونکومایسین از بین رفتند(نمودار ۳). ۴۸ درصد از سویه ها دارای نسبت MIC/MBC ونکومایسین، یک بودند(نمودار ۴).



نمودار۳: توزیع فراوانی MIC و MBC در ونکومایسین(دو درصد از سویه ها نسبت به ونکومایسین مقاومت نشان دادند).



نمودار۴: توزیع فراوانی نسبت MIC/MBC ونکومایسین

بحث

سویه های استافیلوکوکوس اورئوس توانایی زیادی در کسب ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک ها در مقایسه با سایر باکتری ها دارند و این توانایی در کنار قدرت بیماری زایی بالا و همین طور ایجاد بیوفیلم، عفونت حاصل از این باکتری را مبدل به یک نگرانی عمده ساخته است(۵ ،۴).

استافیلوکوکوس اورئوس عامل بیماری زای قدرتمندی است که عفونت های متعددی را ایجاد می کند. این باکتری هم چنین به عنوان یکی از عوامل اصلی در ایجاد عفونت های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه شناخته شده است که دارای طیف مقاومت وسیعی به آنتی بیوتیک های مختلف از جمله بتالاکتام ها ، آمینوگلیکوزید ها ، تتراسایکلین ها ، فلوروکوئینولون ها و ماکرولید ها است. در نتیجه تعداد محدودی از آنتی بیوتیک ها مثل ونکومایسین و تیکوپلانین در درمان عفونت های استافیلوکوکی کاربرد دارند(۱۸, ۱۷).

با توجه به گزارش موارد مقاومت به ونکومایسین، این موضوع یک نگرانی جهانی بوده و لذا کشف دارو های جدید جایگزین بسیار ضروری می باشد. در سال ۲۰۱۴، سیزدهمین مورد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومایسین در ایالات متحده گزارش گردید.

با توجه به اینکه ونکومایسین تنها آنتی بیوتیک موثر بر استافیلوکوکوس اورئوس و بخصوص سویه های MRSA آن می باشد، این مساله و خطر شیوع آن در بیمارستان ها و جوامع، باعث نگرانی مدیران بهداشت امریکا شده است. هرچند هنوز سویه های VRSA شیوع نیافته اند ولی خطر گسترش آن ها همچون سایر سویه های مقاوم وجود دارد(۱۹). در ایران نیز گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری ها، درمان بیماری های عفونی را با مشکل مواجه کرده که چالشی مهم در جامعه پزشکی می باشد.

با توجه به افزایش روز افزون مقاومت های آنتی بیوتیکی در باکتری ها که در اثر روش های درمانی نامناسب و استفاده نابجا از این آنتی بیوتیک ها حاصل شده است، محققین و داروسازان و شرکت های داروسازی سعی در تولید آنتی بیوتیک های جدید جهت جایگزینی با آنتی بیوتیک های قدیمی دارند که این امر در درمان عفونت ها ناشی از باکتری های مقاوم بسیار ضروری است(۲۰).

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(۲۱). این تحقیق اولین گزارش موفق اثر پپتید ملیتین بر سویه های بیمارستانی عفونت سوختگی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس است.

در این مطالعه، ملیتین از زهر زنبور عسل با تکنیک RP-HPLC، با خلوص بسیار بالایی بدست آمد. باتوجه به مقدار MIC90 ملیتین و ونکومایسین که به ترتیب ۴/۳۵ و ۱۶ میکروگرم بودند و مقدار MIC_{100} آن ها که به ترتیب ۸/۷ و ۱۶ میکروگرم بود و اهمیت مقدار MIC در درمان بیماران از دیدگاه پزشکان، می توان گفت که ملیتین در مقادیر کمتری نسبت به ونکومایسین توانسته اثر مهاری خوبی بر سویه های استافیلوکوکوس اورئوس داشته باشد. در نتیجه می توان امیدوار بود که در آینده، ملیتین جایگزین مناسبی برای ونکومایسین در درمان بیماران دچار عفونت سوختگی حاصل از استافیلوکوکوس اورئوس باشد. با توجه به یافته ها می توان نتیجه گرفت که قدرت مهارکنندگی و کشندگی ملیتین دو برابر ونکومایسین بوده و نیز با توجه به مشابهت بالای دیواره سویه های جدا شده اثر مهار رشد و کشندگی ملیتین بر سویه ها تقریبا یکسان است.

در سال ۱۹۹۵، Seiichi Hara و Minoru Yamakawaاز کرم ابریشم (*Bombyx mori*) پپتیدی بنام Moricin جدا کردند که دارای ۴۲ آمینو اسید و همچنین ساختار α هلیکس بود. این پپتید در غلظت ۲µg/ml از رشد استافیلوکوکوس اورئوس(ATCC 6538) جلوگیری کرده است درحالیکه ملیتین در غلظتی برابر با ۵/۵µg/ml هم خاصیت مهار کننده و هم کشندگی سویه (ATCC 29213) استاف اورئوس را دارد(۲۲).

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(۲۳). مقایسه نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که توان ضد باکتریایی ملیتین استخراج شده از زهر زنبور عسل سوری با اثر ملیتین استخراج شده از زهر زنبور ایرانی متفاوت بوده است.

مقایسه MIC حاصل از مطالعه J.F Fennel در سال ۱۹۶۸ با مطالعه حاضر بیان می‌دارد که اثر مهاری ملیتین بر روی گرم مثبت ها در مقادیر کمتری نسبت به گرم منفی ها صورت می‌گیرد(۲۴) که با مطالعه رضایی و همکاران در سال ۱۳۹۲ مطابقت دارد (۲۵).

مومن‌زاده و همکاران در سال ۱۳۹۲ از روش Microdilution Broth جهت نشان دادن اثر ضد باکتریایی پپتید ملیتین بر سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس*(ATCC۲۵۹۲۳) استفاده کردند و بیان داشتند که تاثیر ضد باکتریایی این پپتید بر روی استافیلوکوکوس از تاثیرش بر سویه استاندارد *E-coli* کمتر بوده ولی اثر بهتری در مقایسه با تاثیر ضد باکتریایی این پپتید بر سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* داشته است(۲۶).

مقایسه مطالعات مختلف بین المللی (۲۷،۲۸) با نتایج این تحقیق نشان می دهد که پپتید ملیتین از لحاظ قدرت مهاری و میکروب‌کشی از ونکومایسین قوی تر بوده و این موضوع ثابت می‌کند که تحقیقات بر روی ملیتین ارزش تحقیقی و صنعتی زیادی دارد و می تواند در آینده با بکارگیری روش های مختلف و بهینه سازی روش های سنتز ملیتین، معضل مقاومت به آنتی بیوتیک ها از بین رفته و بیماری های زیادی که ناشی از عفونت های استافیلوکوکوس اورئوس هستند درمان شوند.

REFERENCES

1. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. Clinical microbiology reviews. 2006;19(2):403-434.

2. Order SE, Mason Jr AD, Switzer WE, Moncrief JA. Arterial vascular occlusion and devitalization of burn wounds. Annals of surgery. 1965;161(4):502.

3. Dai T, Huang Y-Y, Sharma SK, Hashmi JT, Kurup DB, Hamblin MR. Topical antimicrobials for burn wound infections. Recent patents on anti-infective drug discovery. 2010;5(2):124.

4. 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):143-150.

5. Rahimi F, Karimi S. Characteristics of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus Strains Isolated From Poultry in Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases. 2015;10(4).

6. Stryjewski ME, Corey GR. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an evolving pathogen. Clinical infectious diseases.2014; 58 (1):10-9.

7. Branski LK, Al-Mousawi A, Rivero H, Jeschke MG, Sanford AP, Herndon DN. Emerging infections in burns. Surgical infections. 2009;10(5):389-397.

8. Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews. 2006;19(3):491-511.

9. Nakatsuji T, Gallo RL. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. Journal of Investigative Dermatology. 2012;132:887-895.

10.Ršolić N. Bee venom in cancer therapy. Cancer and metastasis reviews. 2012;31(1-2):94-173.

11. Robson CH. Bee venom collection apparatus. Google Patents; 1988.

12. 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):349-355.

13. Lubke LL, Garon CF. The antimicrobial agent melittin exhibits powerful in vitro inhibitory effects on the Lyme disease spirochete. Clinical infectious diseases. 1997;25(1):48-51.

14. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nature Reviews Microbiology. 2005;3(3):238-250.

15. Leandro LF, al e. Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A2 of honey bee (Apis mellifera) venom against oral pathogens. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 2015;87(1):147-155.

16. Benton AW, Morse RA, Stewart JD. Venom collection from honey bees. Science. 1963;142(3589):228-230.

17. Chang F-Y, Peacock Jr JE, Musher DM, Triplett P, MacDonald BB, Mylotte JM, et al. Staphylococcus aureus bacteremia: recurrence and the impact of antibiotic treatment in a prospective multicenter study. Medicine. 2003;82(5):333-339.

18. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. Journal of Clinical Investigation. 2003;111(9):1265-1273.

19. Limbago BM, Kallen AJ, Zhu W, Eggers P, McDougal LK, Albrecht VS. Report of the ۱۳ th vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolate from the United States. Journal of clinical microbiology. 2014;52(3):998-1002.

20. Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, et al. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. International journal of antimicrobial agents. 2012;39(4):273-282.

21. Brandenburg L-O, Merres J, Albrecht L-J, Varoga D, Pufe T. Antimicrobial peptides: multifunctional drugs for different applications. Polymers. 2012;4(1):539-560.

22. Seiichi H, Minoru Y. Moricin, a Novel Type of Antibacterial Peptide Isolated from the Silkworm, *Bombyx mori*. The Journel of Biological Chemistry.1995;270(50): 29923–29927.

23. Alia O, Laila M, Antonious A. Antimicrobial effect of melittin isolated from Syrian honeybee (Apis mellifera) venom and its wound healing potential. Int J Pharm Sci Rev Res. 2013;21:318-324.

24. Fennell JF, Shipman WH, Cole LJ. Antibacterial action of melittin, a polypeptide from bee venom. Experimental Biology and Medicine. 1968;127(3):707-710.

25.Rezaei M, Bayat M, Shahbazzadeh D, Momenzadeh M, Pooshang bagheri K. The Antibacterial Activity of Melittin Derived from Iranian Honeybee Venom on Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Veterinary Microbiology. 2014;10(2):131-142.

26. Momenzadeh M, Shahbazzadeh D, Dakhili M, Zolfaghari MR, Pooshang bagheri K. Antibacterial Activity of Melittin Derived from Honey Bee Venom. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2014;18(63)13-18.

27. 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*. Anitmicrobial Agents and Chemotherapy. 2010;54(9):3861-3870.

28. Yeh YCh, Yeh KM, Lin TY, Sh.Kang Ch, Yang YS, Wang YCh , Lin JCh. Impact of vancomycin MIC creep on patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2012;45: 214-220.