

مقاله تحقیقی

بررسی اثر ضد میکروبی اسانس گیاه نعنای فلفلی علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین

محبوبه جعفری^۱، معصومه مهدوی اور تاکنند^{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

*مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: masumehmahdavi@gmail.com

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۱۱

تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۱۸

چکیده

شیوع روزافزون سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) به همراه توانایی این باکتری در ایجاد مقاومت چند دارویی، درمان عفونت های ناشی از این باکتری را با مشکل همراه ساخته است. با توجه به تاثیرات ضد میکروبی اسانس ها، در تحقیق حاضر سعی بر پیدایش راهی مناسب برای غلبه بر مشکل مقاومت آنتی بیوتیک با استفاده از اسانس ها شده است. این تحقیق با هدف بررسی اثر ضد میکروبی اسانس گیاه نعنای فلفلی بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین انجام گرفت. در این مطالعه تعداد ۵۰ سویه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه های عفونی جمع آوری شد. نمونه های مقاوم به متی سیلین با استفاده از دیسک آنتی بیوتیک سفوکسیتین شناسایی شدند. فعالیت ضد میکروبی اسانس نعنای فلفلی به روش میکروداپلوشن براث روی ۲۰ سویه MRSA بررسی شد و حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) آن به دست آمد. بر اساس نتایج به دست آمده، کاربرد اسانس نعنای فلفلی، با دارا بودن اثر ضد میکروبی روی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، می تواند جایگزین مناسبی آنتی بیوتیک ها، در درمان عفونت های ناشی از این باکتری ها باشد.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، MRSA، اسانس نعنای فلفلی، اثر ضد میکروبی.

مقدمه

به عفونت های موضعی از قبیل اندوکاردیت، مننژیت، استئومیلیت حاد و آبسه های منتشر در تمام اعضا می باشد (۷). این باکتری تنوع ژنتیکی قابل توجهی برای مقاومت نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک ها را داشته و بسیاری از جدایه های این باکتری به دلیل مقاومت نسبت به انواع مختلف آنتی بیوتیک ها باعث ایجاد عفونت های وخیم بیمارستانی می شوند. باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

استافیلوکوکوس اورئوس بیماریزاترین گونه استافیلوکوک است که به واسطه تولید آنزیم کواگولاز شناسایی شده و با توجه به توکسین ها و فاکتورهای خارج سلولی متعددی که دارد به شدت پاتوژن است (۶). این باکتری قادر به ایجاد اشکال مختلفی از بیماری ها از قبیل مسمومیت غذایی و باکتری می های خطرناک منجر شونده

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های بالینی و تهیه نمونه استاندارد

در این مطالعه تعداد ۵۰ سویه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های عفونی مختلف افراد مراجعه کننده به بیمارستان پیامبر اکرم (ص) در بهار ۱۳۹۵، جمع‌آوری شد و نمونه‌ها توسط تست‌های بیوشیمیایی افتراقی شامل کاتالاز، کوآگولاز، تخمیر قند مانیتول و DNase مورد بررسی قرار گرفت. نمونه استاندارد باکتریایی مورد مطالعه در این تحقیق (*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) بود که به صورت لیوفیلیزه از کلکسیون میکروبی ایران در انستیتو پاستور خریداری شد.

سنجش فنوتیپی حساسیت آنتی بیوتیکی به روش

دیسک دیفیوژن

تعیین حساسیت جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی بیوتیک‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک (Kirby-Bauer) مطابق با دستورالعمل (CLSI, 2016) انجام شد (۱۱). تمامی محیط‌های کشت استفاده شده از شرکت Merck آلمان تهیه شد. دیسک‌های مورد استفاده در این مطالعه شامل آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین (10 units)، سفوکسیتین (30 µg)، جنتامیسین (10 µg)، اریترومایسین (15 µg)، تتراسایکلین (30 µg) سیپروفلوکسازین (5 µg)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول (1.25/23.75 µg)، ریفامپین (15 µg) (پادتن طب، ایران) بودند. برای انجام آنتی بیوگرام سوسپانسیون باکتری با غلظت ۰/۵ مک فارلند تهیه و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و دیسک‌های آنتی بیوتیک با فاصله منظم، روی آنها قرار گرفت. همچنین از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۶-۲۰ ساعت در دمای ۳۵±۲ درجه سانتی گراد نگه‌داری می‌شوند در هر نمونه باکتری این آزمایش سه بار تکرار شد. بعد از ۲۴

مقاوم به متی سیلین (MRSA) به دلیل مقاومت به عوامل و داروهای ضد میکروبی به یکی از نگرانی‌های عمده سلامت عمومی تبدیل شده است. فراوانی MRSA در سالهای اخیر افزایش قابل توجهی را نشان داده است (۸). استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین یکی از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است که امروزه مقاومت چندگانه‌ای را نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله بتالاکتام‌ها، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها، فلوروکینولون‌ها و ماکرولیدها کسب کرده است. آنتی بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی مانند جنتامیسین و استرپتومایسین زمانی به خوبی مانع رشد استافیلوکوک‌ها می‌شدند، اما استافیلوکوکوس به مرور زمان به این آنتی بیوتیک‌ها نیز مقاوم شد (۹).

در دو دهه اخیر برای افزایش طیف اثر ضد میکروبی آنتی بیوتیک‌ها از ترکیب‌های مختلف از جمله ترکیبات موثره گیاهان استفاده شده است. همچنین عوارض جانبی داروهای شیمیایی و الزامات زیست محیطی سبب گرایش تدریجی به سمت گیاه درمانی شده است. گیاه نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* یکی از گیاهان دارویی پر مصرف است که علاوه بر آثار درمانی به عنوان طعم دهنده در تولید محصولات غذایی مختلف بکار می‌رود (۱۰). خواص ضد میکروبی اسانس این گیاه بر روی تعداد زیادی از میکروارگانیسم پاتوژن انجام شده است بر طبق نتایج به دست آمده از مطالعاتی که روی اسانس نعناع فلفلی انجام شده است، خاصیت ضد میکروبی قوی این گیاه علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی نشان داده شده است. ترکیبات اصلی اسانس این گیاه شامل منتول و منتون می‌باشد و دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بوده و قادر به دام انداختن رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۱). از این رو در این پژوهش به بررسی روش‌های مختلف استفاده از گیاه دارویی نعناع فلفلی با خواص ضد میکروبی بر علیه سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین پرداخته شد.

¹ Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*

طول ستون ۳۰ متر، گاز حامل هلیوم با سرعت ۱ میلی متر در دقیقه بود. مشخصات و شرایط دستگاه MS: مدل 5975C شرکت Agilent Technologies، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای یونیزاسیون ۲۴۰ درجه سانتی گراد بود. طیف های جرمی بدست آمده از دستگاه GC-MS با طیف های جرمی استاندارد موجود در منابع مقایسه گردید (۱۲). برای تایید شناسایی های انجام شده توسط طیف های جرمی، از شاخص بازداری کوتاس مطابق GC-MS استفاده شد. برای تهیه استوک ذخیره اسانس از محلول ۵ درصد DMSO استفاده شد. جهت استریل کردن، محلول ذخیره از فیلترهای میکروبی سر سرنگی ۰/۲ میکرون عبور داده شد.

تعیین حداقل غلظت بازاریاری (MIC) اسانس نعناع فلفلی در سویه های MRSA

این بررسی به روش میکروداپلوشن برات انجام شد. در این روش از میکروپلیت ۹۶ خانه ای استفاده گردید. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۰/۱۲، ۰/۰۶ و ۰/۰۳ میکرولیتر بر میلی لیتر از اسانس گیاه نعناع فلفلی بر اساس روش سریال داپلوشن به یک ردیف از چاهک های میکروپلیت ۹۶ تایی افزوده شد. سوسپانسیون میکروبی که با نیم مک فارلند برابر شده بود به وسیله محیط کشت مولر هینتون برات به میزان ۱/۱۰۰، جهت به دست آوردن تعداد 10^6 CFU/ml $\times 1$ رقیق شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک افزوده شد، در این آزمون به منظور کنترل محیط کشت، از محیط کشت خالی (بدون اسانس گیاه نعناع فلفلی و سوسپانسیون میکروبی) استفاده گردید. به منظور کنترل زمینه از اسانس گیاه نعناع فلفلی و محیط کشت (بدون سوسپانسیون میکروبی) استفاده شد. یک چاهک هم به منزله کنترل DMSO (محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی به همراه DMSO ۵ درصد) در نظر گرفت شد. همچنین سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت بدون اسانس نعناع

ساعت انکوباسیون، قطر هاله های عدم رشد باکتری به وسیله خط کش میلی متری، به طور دقیق و در زیر نور اندازه گرفته می شود و عدد میانگین هر سه پلیت (بر حسب میلی متر) محاسبه گردید. نتایج حاصل از آنالیز داده های به دست آمده هر سویه باکتری به صورت مقاوم، حساس و نیمه حساس با جدول CLSI, 2016 گزارش شد. جهت شناسایی فنوتیپی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، مطابق پروتکل CLSI, 2016 حساسیت نمونه باکتری مورد نظر را نسبت به آنتی بیوتیک سفوکسیتین (30 μ g) و بر اساس قطر هاله ایجاد شده در اطراف دیسک در محیط مولر هینتون مورد بررسی قرار گرفت. در صورتی که قطر هاله ایجاد شده ≥ 22 باشد نمونه را حساس و در صورتی که قطر هاله ≤ 21 باشد نمونه مقاوم در نظر گرفته می شود.

استخراج اسانس نعناع فلفلی و آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده آن

به منظور تهیه اسانس اندام های هوایی، گیاه نعناع فلفلی *Mentha piperita* جمع آوری شده از مزارع تحقیقاتی، به وسیله آسیاب برقی خرد شده و سپس ۲۰۰ گرم از پودر گیاه خشک پس از توزین با دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت اسانس گیری شد. در ادامه، اسانس با سولفات سدیم بدون آب، آبگیری و در ظرف دربسته تیره رنگ، دور از نور و در یخچال نگهداری شد. نمونه آماده شده توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی توام با طیف سنجی جرمی (GC-MS) تزریق گردید از آنجایی که ترکیبات موجود در اسانس ها به لحاظ وزن مولکولی و قطبیت بعنوان مواد فرار شناخته می شوند از این رو عمل جداسازی و شناسایی ترکیبات متشکله اسانس بدست آمده توسط روش کروماتوگرافی گازی توام با طیف سنجی جرمی انجام گردید. مشخصات و شرایط دستگاه GC: 7890A شرکت Agilent Technologies، نوع ستون HP-5MS با قطر داخلی ستون ۰/۲۵ میلی متر، ضخامت فیلم ۰/۳۲ میکرومتر و

² Minimum Inhibitory Concentration

آنالیز ترکیبات موجود در اسانس نعناع فلفلی توسط دستگاه GC-MS انجام شد. طیف های مربوط به هر ترکیب تفسیر و ترکیبات عمده تشکیل دهنده اسانس شناسایی شدند. ترکیب ال-منتول با ۲۳/۸۵ درصد، منتول با ۲۱/۸۲ و منتافوران با ۹/۶ درصد بیشترین مقدار را دارا بود. آنالیز ترکیبات اسانس نعناع فلفلی ترکیبات موجود و درصد آن در جدول ۱ نشان داده شده است.

نتایج تعیین حساسیت جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس

پس از دیسک گذاری و بررسی قطر هاله عدم رشد و تطبیق دادن با جدول CLSI, 2016 باکتری های حساس و مقاوم به آنتی بیوتیک های مورد شناسایی شد. قطر هاله ایجاد شده در اطراف دیسک آنتی بیوتیک سفوکسیتین (30 µg) جهت شناسایی فنوتیپی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در شکل ۱ نشان داده شده است.

فلفلی به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. حجم نهایی تمام چاهک ها ۲۰۰ میکرولیتر بود. در نهایت میکروپلیت ها بر روی شیکر (۲۵۰ rpm) به مدت ۱ دقیقه قرار داده شد تا مخلوط کاملا یکنواخت گردد. سپس میکروپلیت ها در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰-۲۴ ساعت، انکوبه شد. بعد از ۲۴ ساعت وجود کدورت (در مقایسه با ردیف کنترل) حاکی از رشد باکتری و شفافیت نشان دهنده عدم رشد باکتری می باشد. پایین ترین غلظتی که در آن هیچ گونه رشد باکتری مشاهده نشد و فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری بود به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تعیین شد. تمام مراحل برای ۲۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین با ۳ بار تکرار انجام شد. حداقل غلظت بازدارندگی آنتی بیوتیک ونکومایسین نیز به همین روش تعیین شد

نتایج

نتایج آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس نعناع فلفلی

جدول ۱- ترکیبات و درصد موجود در اسانس نعناع فلفلی.

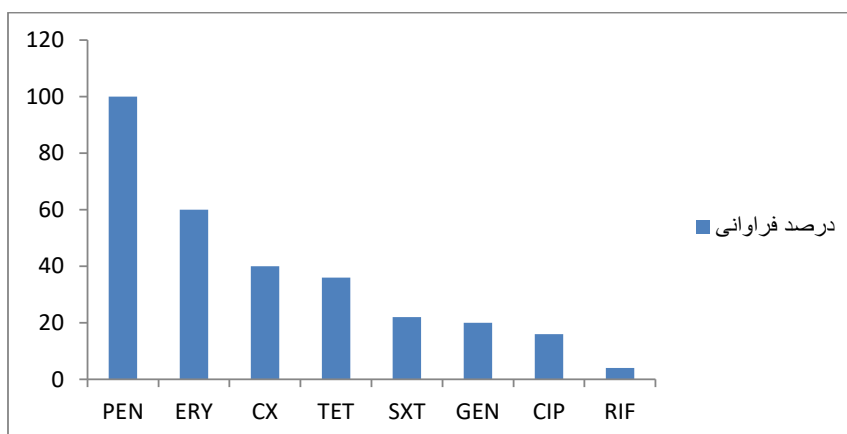
No	Ret Time	Compound	CAS Number	%
1	1.794	Hexane	000110-54-3	0.973591
2	7.457	1S-.alpha.-Pinene	007785-26-4	1.286096
3	8.894	Sabinene	003387-41-5	0.841934
4	9.015	2-.Beta.-Pinene	000127-91-3	1.633306
5	11.153	DL-Limonene	000138-86-3	5.155022
6	11.329	1,8-Cineole	000470-82-6	5.91622
7	17.005	L-Menthol one	014073-97-3	23.85068
8	17.257	Menthofuran	000494-90-6	9.606207
9	17.399	Neoisomenthol	000000-00-0	7.746569
10	18.012	Menthol,	015356-70-4	21.82066
11	18.5	.alpha.-Terpineol	000098-55-5	0.712291
12	20.64	Pulegone	000089-82-7	4.218176
13	20.857	Carvol	000099-49-0	2.928555
14	21.243	Piperitone	000089-81-6	0.549897
15	23.024	Carane	000554-59-6	8.48243
16	28.157	trans-Caryophyllene	000087-44-5	2.701452



شکل ۱ - تصویر دیسک آنتی بیوتیک سفوکسیتین جهت تعیین سویه های MRSA.

جنتامایسین ۲۰٪ (۱۰ سویه)، سیپروفلوکساسین ۱۶٪ (۸ سویه) و ریفامپین ۴٪ (۲ سویه) دیده شد. بر اساس نتایج از ۵۰ سویه مورد مطالعه، ۲۰ سویه (۴۰٪) مقاوم به متی-سیلین تشخیص داده شد. این سویه ها شماره ۳-۷-۱۱-۱۳-۱۴-۲۵-۲۰-۲۳-۲۶-۲۹-۳۰-۳۲-۳۶-۳۷-۳۹-۴۱-۴۳-۵۰-۴۹-۴۶ می باشند. بنابراین برای ادامه کار، این سویه از بین ۵۰ باکتری جدا شد و بقیه مراحل بر روی این ۲۰ سویه انجام شد.

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ۵۰ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی بیوتیک های رایج بررسی شد و نتایج به صورت نمودار در شکل ۲ نشان داده شده است. مقاومت ۱۰۰ درصد نسبت به پنی سیلین در همه استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی مشاهده شد. سپس به ترتیب، مقاومت به اریترومایسین ۶۰٪ (۳۰ سویه)، سفوکسیتین ۴۰٪ (۲۰ سویه)، تتراسایکلین ۳۶٪ (۱۸ سویه)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول ۲۲٪ (۱۱ سویه)،



شکل ۲ - نمودار مقایسه توزیع فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس. پنی سیلین (PEN)، اریترومایسین (ERY)، سفوکسیتین (CX)، تتراسایکلین (TET)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول (SXT)، جنتامایسین (GEN)، سیپروفلوکسازین (CIP) و ریفامپین (RIF).

نتایج بررسی حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس نعناع فلفلی

پس از شناسایی ۲۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، این سویه‌ها از نظر تاثیر اسانس نعناع فلفلی مورد بررسی قرار گرفتند. MIC نعناع فلفلی به‌طور جداگانه در ۲۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به روش میکرودايلوشن برآت تعیین شد همچنین MIC آنتی بیوتیک ونکومايسين هم برای این سویه‌ها بررسی شد (جدول ۲). بر اساس استاندارد CLSI, 2016 تمام سویه‌های MRSA مورد بررسی در این آزمایش، حساس به آنتی بیوتیک ونکومايسين بودند و MIC

آنها کمتر از ۲ میکروگرم بر میلی لیتر بود. MIC نعناع فلفلی بین ۰/۲۵ - ۳۲ $\mu\text{l/ml}$ حاصل شد. نتایج به دست آمده از MIC ونکومايسين و اسانس نعناع فلفلی، به روش آنالیز واریانس با اندازه‌های تکراری توسط نرم افزار SPSS, 19 انجام شد. آزمون یکنواختی واریانس - کواریانس (Mauchly Sphericity Test) انجام گرفت و سطح معنی داری ۰/۰۳۴ نشان عدم وجود خطای واریانس است. در ادامه مقدار F با فرض کرویت واریانس‌ها برابر با ۲/۰۶۹ و معناداری ۰/۱۴۰ محاسبه شد که نشان می‌دهد بین MIC ونکومايسين و اسانس نعناع فلفلی اختلاف معنی دار وجود ندارد.

جدول ۲ - نتایج MIC اسانس نعناع فلفلی و آنتی بیوتیک ونکومايسين بر علیه ۲۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA).

MIC ونکومايسين ($\mu\text{g/ml}$)	MIC نعناع فلفلی ($\mu\text{l/ml}$)	MRSA
۰/۲۵	۱	سویه ۳
۰/۱۲	۰/۲۵	سویه ۷
۰/۱۲	۳۲	سویه ۱۱
۰/۵	۱۶	سویه ۱۳
۱	۴	سویه ۱۴
۰/۲۵	۳۲	سویه ۱۵
۰/۲۵	۳۲	سویه ۲۰
۰/۵	۸	سویه ۲۳
۰/۵	۳۲	سویه ۲۶
۰/۵	۱	سویه ۲۹
۰/۵	۴	سویه ۳۰
۰/۲۵	۱۶	سویه ۳۲
۰/۲۵	۲	سویه ۳۶
۰/۲۵	۱	سویه ۳۷
۰/۱۲۵	۱	سویه ۳۹
۰/۲۵	۳۲	سویه ۴۱
۰/۲۵	۱	سویه ۴۳
۰/۵	۱	سویه ۴۶
۰/۵	۴	سویه ۴۹
۰/۲۵	۸	سویه ۵۰

بحث و نتیجه گیری

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین یکی از عوامل اصلی عفونت های بیمارستانی و اکتسابی از جامعه است که امروزه مقاومت چندگانه ای را نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها از جمله بتالاکتام ها، آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین ها، فلوروکینولون ها و ماکرولیدها کسب کرده است. آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی مانند جنتامیسین و استرپتومایسین زمانی مانع از رشد استافیلوکوک ها می شدند، اما شیوع عفونت های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین روز به روز در حال افزایش است (۲، ۱۳ و ۱۴).

افزایش استفاده از آنتی بیوتیک ها و استفاده نابجا و نامناسب مانند مصرف بیش از حد نیاز و یا عدم رعایت دوز توصیه شده توسط بیماران منجر به گسترش مقاومت باکتریایی به آنتی بیوتیک ها شده است. این امر منجر به افزایش تمایل به توسعه ترکیب های جدید ضد میکروبی موثرتر و بدون سمیت شده است (۱۵). درمان عوامل عفونی مقاوم به آنتی بیوتیک نیازمند مواد ضد میکروبی جدید از منابع خاص می باشد تا بتوان به وسیله راهکارهایی قدرت و طیف اثر ضد میکروبی را افزایش داد. در دو دهه اخیر برای کاهش مقاومت ناشی از آنتی بیوتیک ها از ترکیب های مختلف از جمله ترکیبات موثره گیاهان استفاده شده است (۱۶). خواص ضد میکروبی اسانس های گیاهی شناخته شده است. از ویژگی های مهم اسانس ها و اجزاء تشکیل دهنده آنها خاصیت آبرگریزی آنها می باشد که موجب نفوذ این مواد به لیبیدهای غشاء سلول باکتری و میتوکندری ها می شود و سبب اختلال در ساختمان های آنها و ایجاد نفوذپذیری بیشتر می گردد. این مسئله موجب خروج و نشت یون ها و دیگر محتویات سلولی می شود. اگرچه خروج مقادیر محدود این مواد برای باکتری قابل تحمل است ولی در قابلیت زیستی آن اثر گذاشته و خروج مقادیر وسیع محتویات سلولی یا خروج یونها و ملکول های حیاتی موجب مرگ سلول خواهد شد. ساختار شیمیایی یک اسانس هم بر مکانیسم آن اثر میگذارد و اهمیت حضور گروه

هیدروکسیل تأیید شده است. با توجه به این تاثیرات بیولوژیک، اسانس ها به عنوان جایگزین مناسب برای آنتی بیوتیک ها با اهداف درمانی مورد توجه هستند (۳).

در این مطالعه تعداد ۵۰ سویه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه های عفونی مختلف افراد مراجعه کننده به بیمارستان پیامبر اکرم (ص) در بهار ۱۳۹۵، جمع آوری شد و نمونه ها توسط تست های بیوشیمیایی افتراقی مورد بررسی و تأیید قرار گرفت. مقاومت ۱۰۰ درصد نسبت به پنی سیلین در همه استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی مشاهده شد. سپس به ترتیب، مقاومت به اریترومایسین ۶۰٪ (۳۰ سویه)، سفوکسیتین ۴۰٪ (۲۰ سویه)، تتراسایکلین ۳۶٪ (۱۸ سویه)، تری متوپریم-سولفامتوکسازول ۲۲٪ (۱۱ سویه)، جنتامایسین ۲۰٪ (۱۰ سویه)، سیپروفلوکساسین ۱۶٪ (۸ سویه) و ریفامپین ۴٪ (۲ سویه) دیده شد. ترکیبات اسانس های مورد مطالعه با استفاده از روش GC-MS آنالیز شد و ترکیب ال- منتول با ۲۳/۸۵ درصد، منتول با ۲۱/۸۲ و منتافوران با ۹/۶ درصد بیشترین مقدار را دارا بود. در بررسی های مختلف مهمترین ترکیب های شیمیایی اسانس برگهای نعناع فلفلی را به حضور منتول (۲۱-۵۷٪)، منتون (۲۴-۶٪)، منتوفوران (۸-۱٪) گزارش شده است (۴). منتول مهمترین ترکیب نعناع فلفلی و جز ترین ها است و در ساختار خود دارای یک گروه هیدروکسیلی می باشد. ترین ها قادر هستند که به غشای سلولی صدمه بزنند و در ساختار لیپید دیواره سلولی باکتری ها نفوذ کنند که این امر منجر به دناتوراسیون پروتئینها و از هم پاشیدن ساختار سلولی و تراوش سیتوپلاسم و در نهایت مرگ سلول می شود (۳ و ۱۷). در مطالعه حاضر پس از شناسایی ۲۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین از طریق دیسک سفوکسیتین، این سویه ها از نظر تاثیر اسانس نعناع فلفلی مورد بررسی قرار گرفتند و MIC نعناع فلفلی برای سویه های مقاوم به متی سیلین بین ۳۲-۰/۲۵ μl/ml حاصل شد. Shalayel و همکارانش در سال ۲۰۱۷ اثر ضدباکتریایی عصاره الکلی *Mentha piperita* را بر علیه چند

در تحقیق حاضر اثر ضد میکروبی اسانس نعناع فلفلی با آنتی بیوتیک ونکومایسین مقایسه شد. در حال حاضر ونکومایسین تنها داروی درمان در MRSA است و در مطالعه حاضر نیز سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در برابر آنتی بیوتیک ونکوماسین حساسیت نشان دادند، ولی استفاده نامناسب و بی رویه از این آنتی بیوتیک در سالهای آینده سبب افزایش مقاومت میکروبی نسبت به آن شود و مطالعات وجود سویه های مقاوم (VRSA) یا حدواسط (VISA) در برابر ونکومایسین را با نشان می دهد که هشدار برای جامعه پزشکی است (۲۱) و (۲۲). از این رو در تحقیق حاضر سعی بر پیدایش راهی مناسب برای غلبه بر بروز احتمالی این مشکل شده است. یافته های این پژوهش، خاصیت ضد باکتریایی نعناع فلفلی روی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین را آشکار ساخت و نشان داد که استفاده از این اسانس می تواند منجر به بازدارندگی و مهار رشد این باکتری ها شود. با توجه به اثرات ترکیبات گیاهی، به نظر میرسد کاربرد این ترکیبات می تواند راهکاری مناسب جهت چیره شدن بر مشکل مقاومت میکروبی باشد. حل این معضل بزرگ بهداشت جهانی با انجام پژوهش های بیشتر و کامل تر امکان پذیر است.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا می باشد.

سویه باکتری های پاتوژن انسانی با مقاومت چندگانه دارویی شامل *Streptococcus pyogenes*، *Enterococcus faecalis*، *Escherichia coli*، *Klebsiella aeruginosa pneumoniae* و *Acinetobacter baumannii* و *Stenotrophomonas maltophilia* مطالعه نمودند. نتایج آنها نشان داد که این عصاره در غلظت بین ۱/۲۵-۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر روی باکتری های مورد نظر موثر است (۱۸). Singh و همکارانش در سال ۲۰۱۵ اثر ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی اسانس نعناع فلفلی را بر علیه باکتری های *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumoniae* و *Streptococcus pyogenes* بررسی نمودند و MIC آن را ۰/۴-۰/۷ میکرولیتر بر میلی لیتر به دست آوردند (۱۹). در مطالعه ای که Mahbuobi و همکارانش در سال ۲۰۱۴ انجام دادند، ضمن بررسی ترکیبات اسانس نعناع فلفلی، و اثر ضد میکروبی آن را بر علیه باکتری های طیف وسیعی از باکتری ها بررسی نمودند و MIC این اسانس را بین ۰/۱۲۵ تا بیش از ۶۴ میکرولیتر بر میلی لیتر گزارش نمودند (۲۰). در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۳ انجام شد متوسل و همکارانشان به بررسی اثرات ضد باکتریال عصاره آویشن شیرازی بر استافیلوکوک های مقاوم به متی سیلین پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد که حداقل غلظت مهار کننده این عصاره از ۲ تا ۱۶ میکروگرم در میلی لیتر موثر بود (۵). کاظم الوندی و همکاران، (۱۳۸۹) به بررسی ترکیب شیمیایی و اثر ضد میکروبی اسانس گیاه نعناع فلفلی پرداختند. میزان حداقل غلظت بازدارندگی اسانس بر روی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی به ترتیب ۱۵۰، ۳۰۰ و ۲۵۰ میکرولیتر بر میلی لیتر بدست آمد (۱).

منابع مورد استفاده

۱. کاظم الوندی ر، شریفان ا، آقازاده مشگی م، ۱۳۸۹. بررسی ترکیب شیمیایی و اثر ضد میکروبی اسانس

⁴ Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*

³ Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*

۲. سبحانی پور، م. ح.، منصوری، ش.، سعیدعادلی، ن.، ۱۳۹۳. بررسی شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و تعیین الگوی مقاومت پادزیستی باکتری‌های جدا شده از بینی سربازان آموزشی در شهر کرمان در سال ۱۳۹۰. مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران، ۸(۳): ۱۵-۲۱.
۳. شهینا، م. خاکسار، ر. ۱۳۹۱. بررسی اثرات ضد میکروبی و روش‌های تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس‌های گیاهی بر باکتری‌های پاتوژن. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۷(۵): ۹۴۹-۹۵۵.
۴. عباس عظیمی ر.، رضایی م.، و جایمند ک.، ۱۳۹۴. مقایسه ترکیب‌های شیمیایی اسانس و آناتومی برگ گونه *Mentha piperita* در دو مرحله رویشی و گلدهی. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، ۱۲(۳): ۱۵-۲۷.
۵. متوسل، م.، اخوت، م.، زمردیان، ک.، فرشاد، ش.، ۱۳۹۳. اثر ضد میکروبی عصاره آویشن شیرازی بر استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین. نشریه طب جنوب، ۱۷(۵): ۹۰۰-۹۰۶.
6. Zamani A., Sadeghian S., Ghaderkhani J., Alikhani M. Y., Najafimosleh M., Taghi Goodarzi M., 2007. Detection of methicillin-resistance (*mec-A*) gene in *Staphylococcus aureus* strains by PCR and determination of antibiotic susceptibility. *Ann Microbiol* 57(2): 273-276.
7. Rahimi F., Bouzari M., Vandyousefi J., Maleki Z., Saberi Kashani S., Davoudi S., 2008. Analysis of antibiotic resistance and detection of *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from hospitals and medical laboratories in Tehran. *Iran Biological J* 21: 64-74.
8. Alan, I., Hartstein, M. D., Thomas, T., Ward, M. D., 2016. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Infection Control and Hospital. Epidemiology* 12(1): 9-10.
9. Raygada J. L. and Levine D. P., 2009. Managing CA-MRSA Infections: Current and Emerging Options. *Infections in Medicine* 26(2): 49-58
10. Rita, P. and Animesh, D. K., 2011. An updated overview on peppermint (*Mentha piperita* L.). *International Research Journal of Pharmacy* 2(8): 1-10.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
12. Adams R. P., 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadropole mass spectroscopy carol stream IL: Allured Publishing Crop, p. 465.
13. Chambers, H. F., DeLeo, F. R., 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology* 7(9): 629.
14. Fuda, C., Suvorov, M., Vakulenko, S., B., Mobashery, S., 2004. The basis for resistance to β -lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry* 279(39): 40802-40806.
15. Alvarez-Úria G., Reddy R., 2012. Prevalence and antibiotic susceptibility of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rural area of India: is MRSA replacing methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the community. *ISRN Dermatology* 2012: 1-5.
16. Zouhir, A., Taieb, M., Lamine, M.A., Cherif, A., Jridi, T., Mahjoubi, B., Mbarek, S., Fliss, I., Nefzi, A., Sebei, K. and Hamida, J.B., 2017. ANTISTAPHYBASE: database of antimicrobial peptides (AMPs) and essential oils (EOs) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Staphylococcus aureus*. *Archives of Microbiology* 199(2): 215-222.
17. Izadi, Z., Esna-Ashari, M., Ahmadvand, G., Davoodi, P., Piri, K. H., 2009. Chemical composition and antibacterial activity of the essence oil of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Armaghane Danesh Bimonthly Journal* 14(3): 45-54.
18. Shalayel, M. H. F., Asaad, A. M., Qureshi, M. A., Elhussein, A. B., 2017. Anti-bacterial activity of peppermint (*Mentha piperita*) extracts against some emerging multi-drug

- resistant human bacterial pathogens. Journal of Herbal Medicine 7: 27-30.
19. Singh, R., Shushni, M. A., Belkheir, A., 2015. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. Arabian Journal of Chemistry 8(3): 322-328.
 20. Mahboubi M., Kazempour N., 2014. Chemical composition and antimicrobial activity of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil. Songklanakarin J Sci Technol 36 (1): 83-87.
 21. Sadari, H., Owlia, P., Maleki, Z., Habibi, M., Rahmati, N., 2008. Susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus* isolated from patients of four university-affiliated hospitals in Tehran. Iranian Journal of Pathology 3(3): 161-167.
 22. Mahboubi, M., Bidgoli, F. G., 2010. Anti-staphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. Phytomedicine 17(7): 548-550.