

# Effect of Iron Oxide Nanoparticles and Probiotic *Bifidobacterium Bifidum* on MexA Gene Expression in Drug Resistant Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa*

Raziye Sharif, Kumarss Amini\*

Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Saveh Branch, Saveh, Iran

(Received: 2018/12/26

Accept: 2019/06/3)

## Abstract

**Background:** *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), a common cause of nosocomial infections, has an intrinsic resistance to many antibiotics. Among all the multidrug efflux pumps involved in *P. aeruginosa* drug resistance, MexAB-OprM is the first efflux pump detected to target different classes of antibiotics. The present study aimed to determine the antibacterial effect of iron oxide nanoparticles (IONPs) and probiotic bifidobacterium bifidum (BB) on MexA gene expression, as an important component of the MexAB-OprM multidrug efflux system, in *P. aeruginosa* isolates of the patients referred to major hospitals in Tehran, between 2018-2017.

**Materials and Methods:** In the present descriptive cross-sectional study, a total of 60 isolates of *P. aeruginosa* were isolated from patients admitted to major hospitals of Tehran, Iran. After bacterial identification via biochemical tests, all strains were evaluated for the presence of MexA of MexAB-OprM multidrug efflux pump in *P. aeruginosa* using PCR method. After treatment, broth microdilution method and Real-time PCR were used to assess the antimicrobial activity of IONPs and probiotic BB and the gene expression level of MexA component, respectively. Changes in MexA gene expression were analyzed using the  $-2 \Delta\Delta CT$  method and independent t-test.

**Results:** In the present study, 10 isolates (%16.6) of *P. aeruginosa* harbored MexA gene. The result of MIC testing and gene expression assay showed that IONPs and probiotic BB did not exhibit any inhibitory activity against clinical isolates of *P. aeruginosa* and no change was observed in MexA gene expression.

**Conclusion:** Considering the chromosomally encoded MexA, it can be used as markers for identification of drug resistance of *P. aeruginosa* as essential elements of an effective infection control program. In the view of the inhibitory activity of IONPs and probiotic *Bifidobacterium bifidum* on bacterial growth and the low inhibitory effect of the elements on activity of the MexAb-OprM efflux pump, the study of other contributing factors for the development of multi-drug resistance phenotype, including various other efflux pumps and mechanisms influencing maintenance of resistance should not be ignored.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; iron oxide nanoparticles; probiotic *Bifidobacterium bifidum*; MexA; efflux pump

\*Corresponding author: Kumarss Amini  
Email: dr\_kumarss\_amini@yahoo.com

# بررسی اثر نانو ذره اکسید آهن و پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم بر بیان ژن جزء MexA سیستم افلاکس پمپ در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به دارو راضیه شریف، کیومرث امینی\*

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۳/۱۲

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۱۰/۰۵

## چکیده:

**سابقه و هدف:** سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل مهم بروز عفونت‌های بیمارستانی است و مقاومت ذاتی نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها دارد. در میان پمپ‌های افلاکس مقاومت ضد میکروبی سودوموناس آئروژینوزا، *MexAB-OprM* نخستین پمپ‌های افلاکس شناخته شده در مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها محسوب می‌شود. هدف از این تحقیق، تعیین اثر آنتی‌باکتریال نانو ذره اکسید آهن (*IONP*) و پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم روی بیان ژن جزء مهم از این سیستم افلاکس پمپ به نام *MexA* در ایزوله‌های جدا شده سودوموناس آئروژینوزا از افراد مراجعه کننده به بیمارستان‌های تهران در بین سال‌های ۱۳۹۶ تا ۱۳۹۷ است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی - مقطعی، تعداد ۶۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا در مدت شش ماه، از افراد مراجعه کننده به بیمارستان‌های تهران جمع‌آوری شد. پس از تعیین هویت ایزوله‌ها با استفاده از روش‌های میکروبی / بیوشیمیایی، وجود ژن *MexA* از افلاکس پمپ *MexAB-OprM* در ایزوله‌های جمع‌آوری شده، به صورت مولکولی با روش *PCR* بررسی شد. پس از تیماردهی مواد مهارکننده، از روش برات میکروداپلوشن و تکنیک *Real time-PCR* به ترتیب برای تعیین اثربخشی نانو ذره اکسید آهن (*IONP*) و پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم و بیان ژن جزء *MexA* افلاکس پمپ بر روی باکتری مولد آن استفاده شد. داده‌های مربوط به تغییرهای بیان ژن *MexA* با روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  با استفاده از آزمون آماری  $T$  مستقل در دو گروه تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** از تعداد نمونه‌های بررسی شده که به عنوان باکتری سودوموناس آئروژینوزا تعیین هویت شدند، ۱۰ سویه (۱۶ / ۱۶ درصد) واجد ژن *A mex* بودند. نتایج روش *MIC* و بیان ژن جزء *MexA* نشان داد که نانو ذره اکسید آهن و پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم فعالیت مهارتی و آنتی‌باکتریال پتانسیل ضعیفی برای کاهش عملکرد پمپ افلاکس *MexAB-OprM* در باکتری سودوموناس آئروژینوزا را دارد ( $P > 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** با توجه به حضور ژن *MexA* پمپ افلاکس به صورت کروموزومی در نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا، این فاکتور می‌تواند به عنوان مارکر تشخیصی سویه‌های مقاوم باکتری در برنامه‌های کنترل عفونت با استفاده از روش‌های مولکولی در نظر گرفته شوند. با توجه به پتانسیل بالای نانو ذره اکسید آهن و پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم بر مهار رشد این باکتری و اثر مهارتی پایین این مواد مهارکننده بر فعالیت پمپ افلاکس *MexAB-OprM*، بررسی سایر عوامل مرتبط با ایجاد فنوتیپ مقاومت چند دارویی از جمله سایر پمپ‌های افلاکس و مکانیسم‌های تکامل مقاومت نباید نادیده گرفته شود.

**واژگان کلیدی:** سودوموناس آئروژینوزا، نانو ذره اکسید آهن، پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم، *MexA*، افلاکس پمپ

## مقدمه:

میکروارگانیزم گزارش شده است (۶). سودوموناس آئروژینوزا پتانسیل بیان ۱۲ نوع پمپ تراوشی مقاومت چند دارویی با عنوان Mex-Type Multidrug Resistance Efflux Pump را دارد. از این میان پنج پمپ به نام‌های MexXY-، MexAB-oprM، MexJK-oprM و oprM، MexEF-oprN، MexCD-oprT از مهم‌ترین عوامل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به شمار می‌روند (۷).

MexAB-oprM مهم‌ترین سیستم خروج ترکیب‌های ضد میکروبی از سلول و مقاومت ذاتی دارویی در سودوموناس آئروژینوزا است و برخلاف سایر پمپ‌ها که به صورت اکتسابی و حایز اهمیت بالینی کمتری هستند، تنها پمپ تراوشی است که

سودوموناس آئروژینوزا پاتوژن فرصت طلب گرم منفی است که به دلیل ایجاد عفونت‌های تهدیدکننده حیات، عامل عمده بروز مرگ‌ومیر در بیماران با ضعف سیستم ایمنی محسوب می‌شود (۱، ۲). مقاومت ذاتی و اکتسابی مقاومت چند دارویی به مواد ضد میکروبی در باکتری سبب وخیم‌تر شدن وضعیت درمان عفونت‌های مرتبط با آن می‌شود (۳-۵). سودوموناس آئروژینوزا از طریق مکانیسم‌های مختلفی نسبت به داروهای ضد میکروبی مقاوم می‌شود که در این میان، مکانیسم‌های کروموزومی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایجاد شده توسط سیستم‌های پمپ افلاکس در غشای این

نویسنده مسئول: کیومرث امینی

پست الکترونیک: dr\_kumarss\_amini@yahoo.com

## آماده سازی سوسپانسیون نانو ذرات آهن زیستی و پروبیوتیک پروبیوتیک بیفیدو باکتریوم بیفیدوم:

ذرات نانو آهن از باسیل‌ها و مگنتو باکترها استخراج شد. برای تهیه محلول استوک نانو ذرات، ۱۰ گرم نانو ذره در یک لیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) به عنوان حلالی کمکی به صورت سوسپانسیون در آورده شد و برای پراکنده شدن مناسب آن‌ها از دستگاه التراسونیک Bandelin Sonorex RK 31 H به مدت زمان ۳۰ دقیقه استفاده شد. سوبه پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم با شماره اختصاصی ATCC2522 از مرکز پژوهش‌های علمی-صنعتی ایران خریداری شد.

تهیه استاندارد نیم مک فارلند (Mc Farland Standard) حداقل غلظت ممانعت کننده رشد (MIC) برای نانوذره اکسید آهن و پروبیوتیک با روش برات میکروداپلوشن: برای بررسی تاثیر مواد ضد میکروبی از سوسپانسیون باکتری با تراکم مناسب از استاندارد نیم مک فارلند سولفات باریم استفاده شد. برای تهیه این استاندارد، میزان ۵ درصد میلی‌لیتر از کلرید باریم ۱ درصد با ۹/۹۵ میلی‌لیتر از اسید سولفوریک ۱۶ درصد مخلوط شد. برای تهیه سوسپانسیون باکتری از کلنی تازه کشت شده (۱۶ تا ۲۴ ساعت) برداشت شده و در مقداری سرم فیزیولوژی استریل حل شد و چگالی صحیح کدورت استاندارد (تعیین غلظت میکروبی) با استفاده از اندازه‌گیری جذب در اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ nm بین ۰.۸ درصد تا ۰/۱ مشخص شد.

با استفاده از روش استاندارد کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه‌های بالینی (CLSI)، حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد (MIC) برای اثر آنتاگونیستی نانو ذره آهن و پروبیوتیک در مواجهه باکتری با سوسپانسیون مواد ضد میکروب، از روش برات داپلوشن استفاده شد. MIC به عنوان کمترین غلظت نانو آهن که از رشد ارگانیسیم‌ها در محیط کشت ممانعت می‌کند، در نظر گرفته شد و از روش برات میکروداپلوشن برای سنجش تاثیر غلظت‌های مختلف نانو ذره آهن ( $MIC > 1024 \mu\text{g/mL}$ ) و پروبیوتیک ( $MIC > 56 \mu\text{g/mL}$ ) بر بیان ژن MexA پمپ افلاکس در باکتری مولد آن، ذرات نانوزیستی و پروبیوتیک استفاده شد. در این روش از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای با ۱۲ ردیف که هر کدام حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط تریپتون سویا برات (TSB) استریل بود، استفاده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذره و پروبیوتیک به صورت جداگانه با رقت‌های مشخص به محیط TBS اضافه شد و رقیق‌سازی انجام و در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند به همه چاهک‌ها اضافه شد. همچنین دو ردیف چاهک به عنوان کنترل مثبت (محیط و سوسپانسیون میکروبی) و کنترل منفی تست (محیط و نانوذره آهن) در نظر گرفته شد. میکروپلیت‌ها در انکوباتور شیکردار (۲۰۰ دور در دقیقه، دمای ۳۷ سانتی‌گراد و مدت زمان ۲۴ ساعت (Late log phase) انکوبه‌گذاری شدند.

### استخراج RNA و سنتز cDNA:

استخراج RNA کلی با استفاده از RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) پس از تیمار دهی سوسپانسیون باکتریایی واجد ژن MexA پمپ افلاکس در فاز لگاریتمی رشد ( $OD_{600} = 0.4-0.6$ ) با ذرات نانو اکسید آهن و پروبیوتیک (رقت بعد از MIC) انجام شد. برای حذف DNA ژنومی از کیت RNase-free DNase (Qiagen, Hilden, Germany) استفاده شد. برای اطمینان از صحت استخراج و نمونه مورد نظر، ارزیابی کمی از طریق روش جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۶۰ نانومتر با دستگاه نانودراپ انجام شد. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم AMV Reverse Transcriptase (Roche, Mannheim, Germany) ۲۵ با غلظت ۱ μ/unit انجام شد (۱۹). به این منظور، RNA استخراج شده برای مدت سه دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس فرآیند نسخه‌برداری معکوس در در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه با دو میکرولیتر Random Primer، ۰.۸ میکرولیتر از آنزیم AMV Reverse Transcriptase، دو میکرولیتر از 10mM dNTP، یک میکرولیتر RNasin® Ribonuclease Inhibitor و دو میکرولیتر AMV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer انجام شد. سپس آنزیم AMV در دمای ۹۹ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انکوبه و غیرفعال شد.

### سنجش بیان ژن توسط تکنیک Real-Time PCR:

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت شرکت Genet (bio CAT. NO: Q9210) کره جنوبی به صورت زیر انجام شد: ۱۰ میکرولیتر از Prime

در سوبه‌های وحشی و به صورت ذاتی بیان می‌شود (۸). این وضعیت، پیشرفت استراتژی‌های جایگزین درمانی باکتری‌ها را بر می‌انگیزد و در صورت استفاده از مهارکننده‌های مناسب می‌تواند سبب اختلال در عملکرد این پمپ‌ها برای مهار مقاومت چند دارویی شود.

نانو ذرات اکسید فلزی نظیر اکسید آهن با توجه به پتانسیل ضد میکروبی می‌توانند به عنوان روش جایگزین آنتی بیوتیک‌ها برای مقابله با عفونت‌های باکتریایی موثر باشد (۹-۱۱). نانو ذرات اکسید آهن در غلظت‌های اندک می‌توانند به عنوان منبع تامین یون آهن مورد نیاز میکروارگانیسیم‌ها عمل کرده اما غلظت‌های بالا می‌تواند از طریق واکنش الکترواستاتیکی به غشای باکتری متصل شده و سبب تداخل و تخریب در غشای باکتری شود (۱۰، ۱۲).

پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسیم‌های زنده و غیر بیماری‌زای انسان هستند که با تعدیل فلور میکروبی روده، آثار مفیدی را روی سلامت میزبان دارند. بر اساس مطالعه‌های متعدد آزمایشگاهی (In vitro) و زنده (In vivo) در انسان و حیوانات آزمایشگاهی، خواص ضد میکروبی و مهار پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بر باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی و مثبت مشخص شده است (۱۳-۱۶). هدف از این تحقیق، تعیین اثر آنتی باکتریال نانو ذره اکسید آهن و پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم روی بیان ژن جزء مهم از سیستم پمپ افلاکس MexAB-oprM به نام MexA در ایزوله‌های جدا شده سودوموناس آئروژینوزا از افراد مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های تهران در بین سال‌های ۱۳۹۶ تا ۱۳۹۷ است.

### مواد و روش‌ها:

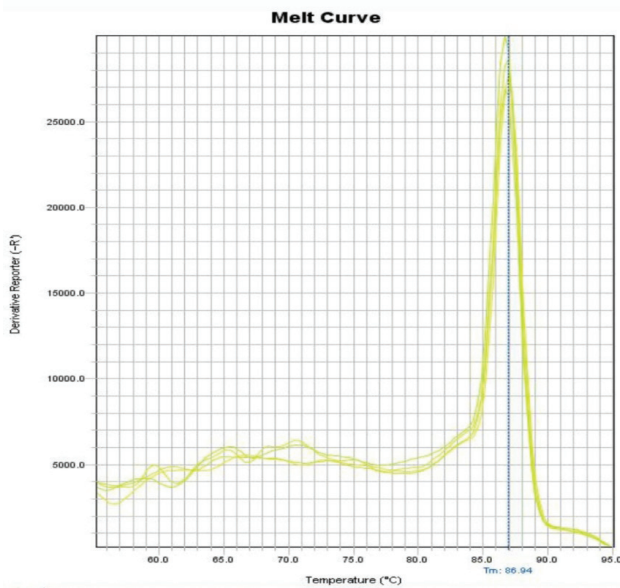
#### نمونه‌گیری و تشخیص ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، تعداد ۶۰ سوبه سودوموناس آئروژینوزا در مدت شش ماه در بین سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۶، از بیماران بستری در بیمارستان‌های شهر تهران که دارای بخ‌های فعال عفونی بودند، جمع‌آوری و نمونه‌ها با تیوب‌های استریل جداگانه حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار به آزمایشگاه منتقل شد. معیارهای خروج از مطالعه مصرف آنتی‌بیوتیک توسط بیمار و نداشتن معیارهای تشخیصی بود و معیارهای ورود برای جمع‌آوری ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا، آزمایش‌های تشخیصی میکروبی/بوشیمیایی بر اساس دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی بالینی (CLSI) (۱۷) شامل رنگ‌آمیزی گرم، تست اکسیداز، کاتالاز، تولیدیگمان پیوسیانین در محیط مولر هینتون آگار، ستریماید آگار، مک کانکی آگار، اکسیداز و کاتالاز، اوره آزانول، MR و VP، ذوب ژلاتین، بررسی تولید گاز، حرکت، رشد در دمای ۴۲ درجه بودند. سوبه‌های با رشد سریع در مرحله لگاریتمی که به عنوان سودوموناس آئروژینوزا تشخیص داده شدند، در محیط کشت تجاری LB Broth حاوی ۲۰ درصد گلیسرول ابتدا در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

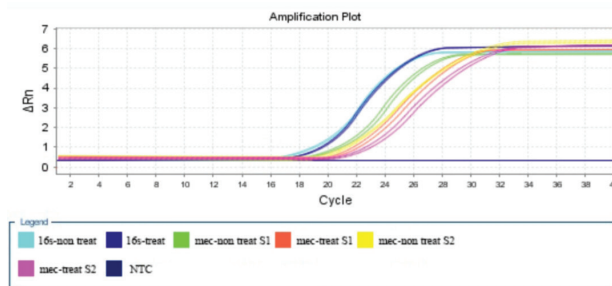
#### استخراج DNA و شناسایی ژن MexA پمپ افلاکس توسط تکنیک PCR:

برای شناسایی مولکولی ژن پمپ افلاکس از ایزوله‌های جمع‌آوری شده، استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج (Qiagen, Hilden, Germany) DNA انجام شد که مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. یک جفت پرایمر طراحی و برای سنتز به شرکت بایونیر (BIONEER Co., Daejeon, South Korea) سفارش داده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده برای mexA-F: CTGACCCGATCTACGTC و mexA-R: GTCTTCACCTCGACACCC و واکنش PCR برای تکثیر ژن MexA پمپ افلاکس با شرایط دمایی و زمانی زیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Gradient Mastercycler Eppendorf انجام شد: واسرشت ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای به مدت ۹۰ ثانیه، ۳۰ سیکل شامل واسرشت در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در انتها گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و سپس نمونه‌ها در چهار درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. در نهایت محصول PCR با هدف آشکارسازی روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری و الکتروفورز و توسط دستگاه UV Transilluminator بررسی شد. در کل واکنش‌های PCR از آب به عنوان کنترل منفی و از باکتری‌های دارای ژن MexA عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

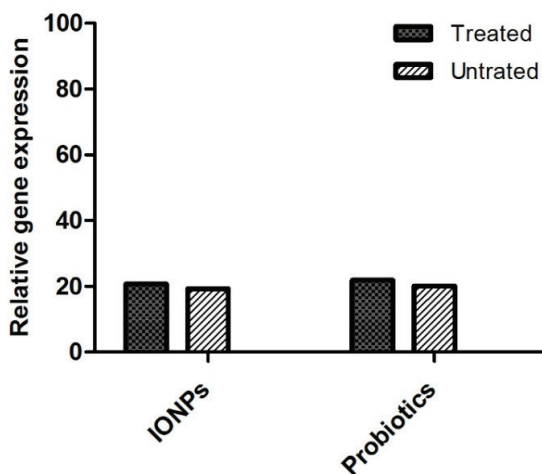
و پروبیوتیک) و گروه تیمار نشده است ( $P=0.091$ ، نمودار ۱).



شکل ۲. آنالیز منحنی ذوب (Melting curve) برای اطمینان از اختصاصی بودن قطعه‌های تکثیر شده ژن MexA که منحنی‌های ژن مورد سنجش در تمام نمونه‌ها با هم منطبق و به صورت تک قله هستند.



شکل ۴-۴. نتایج منحنی تکثیر محصول در Real time PCR بر حسب سیکل



نمودار ۱. میزان بیان ژن MexA در نمونه‌ها تحت تیمار با نانوذره اکسید آهن و پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم. تفاوت معنادار بین نتایج تست و کنترل مشاهده نشد ( $P>0.05$ ). از ژن Beta-Actin برای نرمال سازی نتایج استفاده شد.

5، یک میکرولیتر Qmaster mix (2x) with syber green از Depc water، یک میکرولیتر از هر پرایمر (۱۸)، یک میکرولیتر از Rox dye و دو میکرولیتر از cDNA استفاده شد. تکثیر قطعه‌های مورد نظر در دستگاه Applied Biosystems StepOnePlus با برنامه واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه، تکثیر شامل واسرشت در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۴۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن خانگی بتاکتین به عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد. برای محاسبه میزان بیان نسبی ژن، آنالیز داده‌ها و رسم نمودارهای مربوطه از LightCycler® Relative Quantification Software استفاده شد. داده‌های مربوط به تغییرهای بیان ژن MexA با روش  $\Delta\Delta CT$  با فرض کارایی ۱۰۰ درصد و با استفاده از آزمون آماری مستقل در دو گروه تحلیل شدند. برای به دست آوردن نسبت بیان ژن مورد نظر به ژن مرجع از طریق فرمول زیر بر پایه Efficiency و اختلاف در Ct محاسبه شد (Control: پیش از تیمار و Sample: بعد از تیمار).

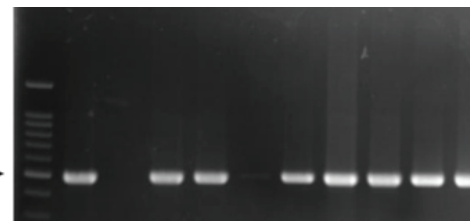
### یافته‌ها:

#### جداسازی و تشخیص سویه‌ها از نمونه‌های بالینی:

در این مطالعه در مجموع ۱۲۰ نمونه که از نمونه‌های ادرار بیمارستان‌های شهر تهران در سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۶ جمع‌آوری شدند، ۶۰ ایزوله (۵۰ درصد) با استفاده از تست‌های تشخیصی و تاییدی میکروبیولوژی/بیوشیمیایی، به عنوان باکتری سودوموناس آئروژینوزا جداسازی و تعیین هویت شدند.

#### نتایج تکثیر ژن حاصل از روش PCR:

واکنش PCR روی تمام ۶۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از ادرار بیماران انجام شد. تکثیر ژن پمپ افلاکس MexA در ایزوله‌های باکتری سودوموناس آئروژینوزا، وجود باند ۵۰۳ bp را در ژل الکتروفورز نشان داد. همچنین سویه سودوموناس آئروژینوزا تولیدکننده ژن مورد نظر به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد (شکل یک). نتایج حاصل از بررسی مولکولی نشان داد که از مجموع ۶۰ سویه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه ادرار، ۱۰ ایزوله (۱۶/۶ درصد) از نظر حضور ژن MexA مثبت بودند.



شکل ۱. نتایج الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن MexA. از چپ به راست: DNA Ladder، کنترل مثبت (+) و کنترل منفی (-)، ستون ۳ و ۱۱ منفی و ستون‌های ۱، ۲، ۴ تا ۱۰ و ۱۲ نمونه‌های مثبت حاوی ژن MexA سودوموناس آئروژینوزا (طول قطعه مورد نظر ۵۰۳ جفت باز است).

#### نتایج آزمون MIC:

نتایج حاصل از MIC نشان می‌دهد که دامنه حداقل غلظت مهار رشد در سویه‌های جدا شده سودوموناس آئروژینوزا برای نانوذره اکسید آهن ۲۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش گردید.

#### بیان ژن MexA بعد از نزدیکی با مهارکننده‌های پمپ افلاکس:

برای مقایسه تاثیر نانوذره اکسید آهن و پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم بر بیان ژن MexA، بعد از استخراج RNA و سنتز cDNA، بیان ژن به صورت کمی در ایزوله‌های دو گروه سلولی تیمار شده با و تیمار نشده با استفاده از آنالیز منحنی ذوب (Melting curve analysis) و منحنی تکثیر بررسی شد (شکل ۲ و ۳). میزان بیان ژن MexA در ایزوله‌های تیمار شده با نانوذره اکسید آهن و پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم نسبت به ایزوله‌های کنترل تغییراتی نشان نداد و بر اساس نتایج به دست آمده از سنجش بیان ژن، P value برای ژن MexA از میزان ۰.۰۵ بیشتر است که بیانگر نبود اختلاف آماری معنادار در بیان این ژن در بین دو گروه تیمار شده (نانوذره اکسید آهن



**بحث:**

سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی به ویژه در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی و کودکان است (۲، ۲۰). شیوع بیمارستانی و عفونت‌های ناشی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از جمله آمینوگلیکوزیدها، کینولون‌ها و بتالاکتام‌ها گزارش شده است که به یکی از معضله‌های جدی بهداشت تبدیل شده است (۵). امروزه پمپ‌های افلاکس فعال به عنوان یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت ذاتی و اکتسابی آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها مطرح شده‌اند (۲۱). نتایج روش MIC و بیان ژن جزء MexA در این مطالعه نشان داد که نانو ذره اکسید آهن و پروبیوتیک بیفیدو باکتریوم بیفیدیوم فعالیت مهاری و آنتی‌باکتریال پتانسیل ضعیفی برای کاهش عملکرد پمپ افلاکس MexAB-OprM در باکتری سودوموناس آئروژینوزا را دارد.

مطالعه‌ها نشان می‌دهند برخی پمپ‌های افلاکس نظیر mexXY-oprM در مقاومت اکتسابی سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آمینوگلیکوزیدها نقش دارند و این دسته از پمپ افلاکس‌ها وابسته به درجه تماس باکتری با غلظت دارو هستند (۲۲). در مقابل شواهد نشان می‌دهد پمپ افلاکس mexAB-oprM مقاومت ذاتی برای باکتری را فراهم می‌کند چرا که در سویه‌های وحشی این باکتری بیان می‌شوند. در این مطالعه شناسایی مولکولی با استفاده از روش PCR، حضور ژن پمپ افلاکس MexA را در ۱۶/۶ درصد نمونه‌ها را نشان داد. از آنجا که ژن‌های mexAB-oprM، ژن‌های کروموزومی هستند و در تمامی سویه‌های وحشی وجود دارند، حضورناشتن این مجموعه ژنی در سویه‌ها، می‌تواند ناشی از جهش باشد. در پژوهشی که صالحی و همکاران در سال ۹۲ روی نمونه‌های بالینی انجام دادند ۲۷ درصد جدایه‌ها، ژن‌های mexAB-oprM را روی کروموزوم خود داشتند که با مطالعه حاضر همخوانی دارد (۲۳). مطالعه انجام شده در شهر همدان توسط عربستانی و همکاران نشان‌دهنده حضور ژن‌های mexAB-oprM در ۱۰۰ درصد سویه‌های جدایشده بود (۱۸). همچنین در مطالعه دیگر، حضور اپرون پمپ افلاکس mexAB-oprM در سودوموناس آئروژینوزا سیتی سمیک با فراوانی ۱۰۰ درصد نمونه‌ها برای هر سه ژن‌های اپرون mexA، mexB و ژن تنظیمی mexR گزارش شد که نشان‌دهنده کروموزومی بودن ژن‌های پمپ افلاکس MexAB-oprM است (۲۴) و می‌تواند به عنوان ابزار تشخیصی برای شناسایی ایزوله‌های SPA توسط روش‌های مولکولی در نظر گرفته شود (۲۵).

Doudi و همکاران با بررسی تاثیر نانو ذرات نقره روی باسیل‌های گرم منفی بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام با طیف گسترده (ESBLs) از جمله

سودوموناس آئروژینوزا نشان دادند که نانوذره نقره در حضور غلظت ۵۰۰ ppm نانو ذره بالاترین قطر هاله عدم رشد را نشان دادند (۲۶). در مطالعه‌های پسین که به بررسی تاثیر نانوذره اکسید روی بر بیان ژن‌های ویروالانس و تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا با روش RT-PCR پرداخته بودند، نشان داده شد که یون‌های روی و نانوذرات ZnO به طور قابل توجهی مانع از تشکیل بیوفیلم و تولید بیوسیانین، سیگنال کینولون و فعالیت همولیتیک سودوموناس آئروژینوزا می‌شوند (۲۷، ۲۸). نتایج مطالعه Haney و همکاران بر ارزیابی آثار نانو ذرات آهن روی بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا نشان می‌دهد که غلظت ۱۰۰ μM از نانو پارسیکل آهن به نبود شکل‌گیری بیوفیلم منجر می‌شود (۲۹). در مطالعه کنونی، نتایج روش MIC و بیان ژن جزء MexA نشان داد که نانو ذره اکسید آهن و پروبیوتیک بیفیدو باکتریوم بیفیدیوم فعالیت مهاری و آنتی‌باکتریال پتانسیل پایینی برای کاهش عملکرد پمپ افلاکس MexAB-OprM در باکتری سودوموناس آئروژینوزا را دارد. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که پروبیوتیک بیفیدو باکتریوم بیفیدیوم با اثر روی فاکتورهای موثر سیستم ایمنی سبب کاهش دوره و شدت عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا می‌شود (۳۰). تاثیر این ماده مهارکننده روی عملکرد سایر اجزای پمپ افلاکس MexAB-OprM و رشد باکتری، نیاز به مطالعه‌های بیشتر دارد که باید به عنوان پیشنهاد برای مطالعه‌های بعدی در نظر گرفته شود. از نقاط قوت این مطالعه، ارزیابی همزمان حضور ژن MexA پمپ افلاکس در ژنوم سودوموناس آئروژینوزا به عنوان بازیگر مهم در بروز مقاومت دارویی و بررسی فعالیت مهاری نانو ذره اکسید آهن و پروبیوتیک بیفیدو باکتریوم بیفیدیوم بر مهار فعالیت پمپ افلاکس و رشد باکتری است که با بررسی آن، بتوان الگوی درمانی مناسب جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها در بیماران آلوده به این اشکال مقاوم به آنتی‌بیوتیک باکتری ارایه کرد.

**نتیجه‌گیری:**

با توجه به حضور ژن‌های پمپ افلاکس MexAB-OprM به صورت کروموزومی در نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا، اجزای این کمپلکس از جمله ژن پمپ افلاکس MexA می‌توانند به عنوان ابزار تشخیصی در شناسایی مولکولی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به دارو استفاده شوند. با توجه به پتانسیل بالای نانو ذره اکسید آهن و پروبیوتیک بیفیدو باکتریوم بیفیدیوم بر مهار رشد این باکتری و اثر مهاری پایین این مواد مهارکننده بر فعالیت پمپ افلاکس MexAB-OprM، بررسی سایر عوامل مرتبط با ایجاد فنوتیپ مقاومت چند دارویی از جمله سایر پمپ‌های افلاکس و مکانیسم‌های تکامل مقاومت نباید نادیده گرفته شود.

**منابع:**

- Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;171(11):1209-23.
- Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and disease*. 2013;67(3):159-73.
- Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical microbiology and infection*. 2007;13(6):560-78.
- Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017;7:39.
- Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in medicinal chemistry*. 2014;6:PMC. S14459.
- Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology spectrum*. 2016;4(2).

- Goli HR, Nahaei MR, Rezaee MA, Hasani A, Kafil HS, Aghazadeh M, et al. Role of MexAB-OprM and MexXY-OprM efflux pumps and class 1 integrons in resistance to antibiotics in burn and Intensive Care Unit isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of infection and public health*. 2018;11(3):364-72.
- Nehme D, Poole K. Assembly of the MexAB-OprM multidrug pump of *Pseudomonas aeruginosa*: component interactions defined by the study of pump mutant suppressors. *Journal of bacteriology*. 2007;189(17):6118-27.
- Hemeg HA. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *International journal of nanomedicine*. 2017;12:8211.
- Slavin YN, Asnis J, Häfeli UO, Bach H. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *Journal of nanobiotechnology*. 2017;15(1):65.
- Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International journal of nanomedicine*. 2017;12:1227.
- Iida H, Takayanagi K, Nakanishi T, Osaka T. Synthesis of

- Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with various sizes and magnetic properties by controlled hydrolysis. *Journal of colloid and interface science*. 2007;314(1):274-80.
13. Karimi S, Rashidian E, Birjandi M, Mahmoodnia L. Antagonistic effect of isolated probiotic bacteria from natural sources against intestinal *Escherichia coli* pathotypes. *Electronic physician*. 2018;10(3):6534.
14. Fijan S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International journal of environmental research and public health*. 2014;11(5):4745-67.
15. Behnsen J, Deriu E, Sassone-Corsi M, Raffatellu M. Probiotics: properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013;3(3):a010074.
16. Denkova R, Denkova Z, Yanakieva V, Blazheva D. Antimicrobial activity of probiotic lactobacilli, bifidobacteria and propionic acid bacteria, isolated from different sources. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. 2013:857-64.
17. Dudley MN, Ambrose PG, Bhavnani SM, Craig WA, Ferraro MJ, Jones RN, et al. Background and rationale for revised Clinical and Laboratory Standards Institute interpretive criteria (breakpoints) for Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*: I. Cephalosporins and aztreonam. *Clinical infectious diseases*. 2013;56(9):1301-9.
18. Arabestani MR, Rajabpour M, Yousefi Mashouf R, Alikhani MY, Mousavi SM. Expression of efflux pump MexAB-OprM and OprD of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples using qRT-PCR. *Archives of Iranian medicine*. 2015;18(2):102-8.
19. Von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, Duyster J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *The Lancet*. 2002;359(9305):487-91.
20. Silva Filho LVRF, Ferreira FdA, Reis FJC, Britto MCAd, Levy CE, Clark O, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: scientific evidence regarding clinical impact, diagnosis, and treatment. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2013;39(4):495-512.
21. Webber MA, Coldham NG. Measuring the activity of active efflux in Gram-negative bacteria. *Antibiotic resistance protocols: Springer*; 2010. p. 173-80.
22. Hocquet D, Vogne C, El Garch F, Vejux A, Gotoh N, Lee A, et al. MexXY-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(4):1371-5.
23. SALEHI M, HEKMATDOOST M, HOSSEINI F. Quinolone resistance associated with efflux pumps mexAB-oprM in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. 2014.
24. Al-Grawi IGA. Occurrence of MexAB-OprM efflux pump operon on septicemic *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *Iraqi Academic Scientific Journal*. 2012;11(1):97-102.
25. Mesaros N, Glupczynski Y, Avrain L, Caceres NE, Tulkens PM, Van Bambeke F. A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007;59(3):378-86.
26. Doudi M, Naghsh N, Heiedarpour A. The effect of silver nanoparticles on Gram-negative bacilli Resistant to Extended-Spectrum B-Lactamase Enzymes. *Medical Laboratory Journal*. 2011;5(2):44-51.
27. Dosunmu E, Chaudhari AA, Singh SR, Dennis VA, Pillai SR. Silver-coated carbon nanotubes downregulate the expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes: a potential mechanism for their antimicrobial effect. *International journal of nanomedicine*. 2015;10:5025.
28. Lee J-H, Kim Y-G, Cho MH, Lee J. ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiological research*. 2014;169(12):888-96.
29. Haney CE. *Effects on Iron Nanoparticles on Pseudomonas Aeruginosa Biofilms*: University of Dayton; 2011.
30. Ku S, Park MS, Ji GE, You HJ. Review on bifidobacterium *bifidum bgn4*: Functionality and nutraceutical applications as a probiotic microorganism. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(9):1544.