

Effect of silver nanoparticles on rmtB gene expression in aminoglycoside resistant clinical isolates in *Pseudomonas aeruginosa*

Bager Alkhikani¹, Farahnaz Molavi^{1*}, Maryam Tehranipoor¹

1- Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Iran.

Received: June 23, 2021; Accepted: December 05, 2021

Abstract

Background and Aim: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that causes widespread infections in hospitals. *Pseudomonas aeruginosa* has become resistant to a variety of antibiotics due to the overuse of antibiotics. One type of resistance acquired by this bacterium is resistance to aminoglycoside drugs. The most important mechanism of this resistance is the enzymatic inactivation of aminoglycosides by their modifying enzymes. The rmtB gene is involved in this resistance and because silver nanoparticles have antibacterial properties, the present study was conducted to evaluate the expression level of rmtB gene in *Pseudomonas aeruginosa* specimens treated with silver nanoparticles.

Methods: In the current study experimental, 53 samples were collected from 11 laboratories in Mashhad during 1398-1399. Samples were identified using standard laboratory methods and specific culture. PCR method was used to evaluate the frequency of rmtB gene. In order to evaluate the antibiotic susceptibility pattern of the strains, the disk diffusion method based on the CLSI protocol (2018) was used. Silver nanoparticles were made from ginger extract and Real time PCR was used to investigate the effect of silver nanoparticles on rmtB gene expression.

Results: Out of 53 samples of *Pseudomonas aeruginosa*, 51 samples were resistant to more than two aminoglycosides. Phenotypic evaluation of the antibiotic resistance pattern of aminoglycoside-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains showed that 61% were resistant to amikacin, 84% to gentamicin and 23% to tobramycin. Also, out of 53 samples, 76% were resistant to all three aminoglycosides. The minimum inhibitory concentration in the agar dilution method for silver nanoparticles was up to 500 µg/ml. Molecular analysis showed the presence of rmtB gene in all samples and the result of real time PCR analysis showed that the effect of silver nanoparticles on rmtB gene expression was significant ($P < 0.01$).

Conclusion: There was high resistance to aminoglycoside in samples collected from Mashhad. Silver nanoparticles had a significant effect on reducing the expression of rmtB gene ($P < 0.01$).

Keywords: *Pseudomonas*; Nanoparticles; Antibiotics; Iran, Mashhad.

Please cite this article as: Alkhikani B, Molavi F, Tehranipoor M. Effect of silver nanoparticles on rmtB gene expression in aminoglycoside resistant clinical isolates in *Pseudomonas aeruginosa*. *Pejouhesh dar Pezeshki*. 2022;46(2):1-10.

*Corresponding Author: Farahnaz Molavi; Email: Farahmolavi@gmail.com

بررسی اثر نانوذرات نقره روی بیان ژن rmtB در جدایه‌های بالینی مقاوم به آمینوگلیکوزید در باکتری سودوموناس آئروژینوزا

باقر الخیکانی^۱، فرحناز مولوی^{۱*}، مریم طهرانی پور^۱

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۴

خلاصه

سابقه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت‌طلب است که عفونت گسترده‌ای در بیمارستان‌ها ایجاد می‌کند. به دلیل استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها، سودوموناس آئروژینوزا به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده است. یکی از انواع مقاومت‌های کسب شده توسط این باکتری، مقاومت به داروهای آمینوگلیکوزید است. مهم‌ترین مکانیسم این مقاومت غیرفعال‌سازی آنزیماتیک آمینوگلیکوزیدها توسط آنزیم‌های تغییردهنده آن‌هاست. ژن rmtB در این مقاومت نقش دارد و به دلیل اینکه نانوذرات نقره خاصیت ضدباکتریایی دارند، هدف این مطالعه ارزیابی سطح بیان ژن rmtB در نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم شده‌ای است که تحت تیمار نانوذرات نقره بوده‌اند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۵۳ نمونه از ۱۱ آزمایشگاه سطح شهر مشهد در سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۹ جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد آزمایشگاهی و کشت اختصاصی تعیین هویت شدند. برای بررسی فراوانی ژن rmtB از روش PCR استفاده شد. برای ارزیابی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، از روش انتشار دیسک بر اساس پروتکل CLSI (۲۰۱۸) استفاده شد. نانوذرات نقره توسط عصاره زنجبیل ساخته شدند و برای بررسی اثر نانوذرات نقره بر بیان ژن rmtB از روش Real time PCR استفاده شد. میزان مقاومت با آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با آزمون کای دو قضاوت آماری شد.

یافته‌ها: از ۵۳ نمونه سودوموناس آئروژینوزا، ۵۱ نمونه به بیش از دو آمینوگلوکوزید مقاوم بودند. ارزیابی فنوتیپی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به آمینوگلوکوزید نشان داد که ۶۱ درصد به آمیکاسین، ۸۴ درصد به جنتامایسین و ۲۳ درصد به توبرامایسین مقاومت داشتند. همچنین از ۵۳ نمونه، ۷۶ درصد به هر سه آمینوگلیکوزید بررسی‌شده مقاوم بودند. حداقل غلظت بازدارندگی در روش رقت در آگار برای نانوذرات نقره تا رقت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. بررسی ملکولی نشان‌دهنده حضور ژن rmtB در تمام نمونه‌ها بود و نتیجه بررسی Real time PCR نشان داد که تاثیر نانوذرات نقره روی بیان ژن rmtB معنادار است ($P < 0/01$).

نتیجه‌گیری: مقاومت بالایی نسبت به آمینوگلیکوزید در نمونه‌های جمع‌آوری شده از شهر مشهد وجود داشت. نانوذرات نقره تاثیر معنادار روی کاهش بیان ژن rmtB داشتند.

واژگان کلیدی: سودوموناس؛ نانوذره؛ آنتی‌بیوتیک، ایران، مشهد.

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Alkhikani B, Molavi F, Tehranipoor M. Effect of silver nanoparticles on rmtB gene expression in aminoglycoside resistant clinical isolates in Pseudomonas aeruginosa. Pejouhesh dar Pezeshki. 2022;46(2):1-10.

*نویسنده مسئول مکاتبات: فرحناز مولوی؛ آدرس پست الکترونیکی: farahmolavi@gmail.com

آماده شود (۸). برای بررسی خصوصیت فیزیکی نانوذره به دست آمده از روش‌های عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری (دانشگاه فردوسی مشهد)، FTIR (Bruker Tensor)، دانشگاه آزاد واحد مشهد) و دستگاه طیف سنج پراش پرتو ایکس XRD Explorer GNR، دانشگاه فردوسی مشهد) استفاده شد.

برای ارزیابی حساسیت باکتری در برابر نانوذرات نقره از سه روش انتشار چاهک در آگار، انتشار دیسک در آگار و روش ماکرودیلوشن (روش سری رقت در لوله) استفاده شد (۸).

برای تهیه سری رقت از نانوذرات از روش رقت‌سازی سریال از نانوذره نقره، سری رقت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ و ۱۵/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد.

استخراج RNA: استخراج RNA بعد از تیماردهی سوسپانسیون باکتری دارای ژن rmtB با نانوذره نقره (با رقت بعد از حداقل غلظت بازدارندگی رشد) انجام شد. این کار توسط کیت Total RNA Extraction mini Kit (یکتا تجهیز آزما، ایران) انجام شد. ارزیابی کمی از طریق روش جذب نوری سپس نمونه‌های استخراج شده بررسی اسپکتروفتومتری شد.

ساخت cDNA: پس از تأیید مقدار و غلظت RNA ساخته شده در مرحله قبل، ساخت cDNA از RNA استخراج شده با استفاده از کیت cDNA Synthesis Kit (یکتا تجهیز آزما، تهران) انجام شد.

PCR ژن rmtB: پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش با نرم‌افزار الیگو طراحی، و برای سنتز به شرکت سیناکلون ایران سفارش داده شدند (جدول ۱). واکنش PCR-M به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵/۵ میکرولیتر (ایران، سیناکلون) PCR master mix 5X دارای ۰/۵ U/μl Taq DNA polymerase، ۳Mm 3 MgCl₂ ۰/۴ mM از dNTPs ۱۰ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، یک میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۱۰/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) با برنامه دمایی، یک سیکل دناتوراسیون اولیه شامل: ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه، واسرشته‌شدن^۱ ۹۴ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر^۲ ۵۸ درجه برای ۳۰ ثانیه، طولیل شدن^۳ ۷۲ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه

برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل شد و سوسپانسیونی با کدورت نیم مک‌فارلند در سرم فیزیولوژی تهیه شد، سپس با استفاده از سوآب پنبه‌ای سترون از سوسپانسیون باکتری به صورت یکنواخت و چمنی در سطح محیط مولر-هینتون آگار تلقیح شد. پس از چند دقیقه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی را با استفاده از پنس سترون در سطح محیط کشت قرار داده، سپس پلیت‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد با استفاده از خط‌کش انجام گرفت و با استفاده از جدول استاندارد، وضعیت مقاومت و حساسیت به هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها مشخص شد. ایزوله‌های دارای الگوی یکسان، در یک گروه قرار گرفتند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استفاده شده در این تحقیق از شرکت پادتن طب تهیه شد و شامل: آمیکاسین (۳۰ μg)، توبرامایسین (۱۰ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg) بود. برای بررسی سنجش حساسیت باکتری‌ها در برابر نانوذره نقره از سه روش انتشار چاهک در آگار، انتشار دیسک در آگار و روش ماکرودیلوشن (روش سری رقت در لوله‌های بزرگ) استفاده شد. برای تهیه سری رقت از نانوذرات از روش رقت‌سازی سریال از نانوذره نقره، سری رقت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ ppm تهیه شده و بر جدایه‌های مقاوم در میکروپلیت ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تاثیر داده شد.

ساخت نانوذره نقره: نانوذرات نقره به روش سبز و با استفاده از عصاره زنجبیل ساخته شد. برای این منظور پودر زنجبیل در آب مقطر حل شد (به ازای هر گرم پودر زنجبیل ۱۰ سی‌سی آب مقطر استریل استفاده شد) محلول به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد و سپس به ویال ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد. این ویال ۱۲ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ به یک پلیت منتقل شده و در مجاورت شعله فیلتر شد. ۱۰ میلی‌لیتر از این عصاره فیلتر شده به ویال ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد و با ۱۰ میکرولیتر از محلول نیترات نقره یک‌میلی مولار مخلوط شد. بعد از تغییر رنگ، محلول در میکروتیوپ‌های دومیلی لیتری ریخته شده و با دور ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی خارج شده و دو میلی لیتر آب دیونیزه یا آب مقطر به رسوب اضافه و سانتریفیوژ تکرار شد. این مرحله سه بار دیگر تکرار شد و در انتها رسوب نهایی در پلیت‌های جداگانه ریخته شد و در محل تاریک گذاشته شد تا خشک شود و پودر نانوذره

¹ Denaturation

² Annealing

³ Extension

۱ دقیقه	۹۴	واسرشته‌شدن	۲
۱ دقیقه	۵۸	اتصال پرایمر	۳
۱ دقیقه	۷۲	طویل شدگی	۴
۷ دقیقه	۷۲	طویل شدگی نهایی	۵
چرخه ۴-۲		۳۵	

یافته‌ها

تمام ۵۳ نمونه سودوموناس آئروژینوزا که از آزمایشگاه‌های سطح شهر مشهد جمع‌آوری شدند به عنوان سودوموناس آئروژینوزا تأیید شدند. نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی: ارزیابی فنوتیپی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به آمینوگلوکوزیدها نشان داد که آمیکاسین ۶۱ درصد، توبرامایسین ۲۳ درصد و ۸۴ درصد به جنتامایسین مقاومت داشتند. بالاترین مقاومت به جنتامایسین و کمترین مقاومت در برابر توبرامایسین بود. از ۵۳ نمونه ۷۶ درصد به هر سه آمینوگلیکوزید بررسی شده مقاوم بودند. بررسی ملکولی نشان‌دهنده حضور ژن rmtB در تمام نمونه‌ها بود. آزمون نشان داد که میزان مقاومت با آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به لحاظ آماری معنادار بود ($P < 0.01$).

نتایج MIC نانوذرات نقره نشان داد که بهترین غلظت کشندگی ۵۰ درصدی سلول‌ها توسط نانوذره نقره با غلظت ۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ بود (بهترین غلظت، غلظتی است که توان کشندگی حدود ۵۰ درصد سلول‌ها را داشته باشد تا با بقیه سلول‌ها که زنده مانده‌اند بتوان بخش آنالیز ملکولی را انجام داد). در این مطالعه تمامی نمونه‌ها دارای ژن rmtB بودند. شکل شماره ۱ نتیجه محصول PCR ژن rmtB بعد از انجام الکتروفورز است. وجود باند ۲۰۰ جفت بازی نشان‌دهنده مثبت بودن از نظر وجود ژن rmtB است. **بررسی خواص ضد باکتریایی نانوذرات نقره:** فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره تولیدشده از عصاره زنجبیل با مشاهده اندازه‌گیری هاله محدودیت رشد باکتری در اطراف دیسک‌های حاوی محلول نانوذرات نقره برای تمامی نمونه‌های تحت آزمایش مشاهده شد و محلول حاوی نانوذرات نقره دارای فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های آزمایش بود و هاله قابل تشخیص که حاصل جلوگیری از رشد میکروب توسط نانوذرات نقره است در تمام تیمارهای اصلی در مقایسه با نمونه‌های شاهد که عصاره، آب مقطر و نیترات نقره بودند، مشاهده شد.

بررسی ریخت‌شناسی نانوذره نقره سنتز شده: بررسی نانوذره نقره با میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد که نانو

سلسیوس برای ۱۰ دقیقه انجام شد (۸). محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد و در کنار DNA Ladder 50bp در بافر TBE به مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۱۰۰ انجام شد (۱۰).

برای رنگ آمیزی ژل، آن را به مدت ۱۵ دقیقه در تانک حاوی اتیدیوم بروماید قرار داده و نتایج توسط دستگاه Geldocument (Genet bio CAT. NO: Q9210) با نور UV مشاهده شد.

میزان تغییر بیان ژن با استفاده از نرم افزار SPSS16 و آزمون One way ANOVA تجزیه و تحلیل شد. در تمام موارد سطح معناداری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده در Real-time PCR

اندازه	توالی نوکلئوتیدی	ژن	محصول (bp)
200	F'-GTGCGTGTATTCAATCGCCC R5'-AAATCCGCGGTACGGTATCC'	rmtB	
159	F:CCCAACCCTTTTCCTTACTTGC R:CATCAACTTCACCTTCACGC	16S RNA	

سنجش بیان ژن به وسیله تکنیک Real-time PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت مخصوص کره جنوبی^۱ به صورت زیر انجام شد: ۱۰ میکرولیتر از Prime Qmaster mix (2x) with syber green ، ۵ میکرولیتر از Depc water، یک میکرولیتر از هر پرایمر، یک میکرولیتر از Rox dye و دو میکرولیتر از cDNA استفاده شد. تکثیر قطعه‌ای مورد نظر مطابق جدول شماره ۲ در ۳۵ چرخه انجام شد (۸).

آنالیز داده‌ها در نمونه‌های تیمار شده و کنترل به کمک معادله داده‌ها و رسم نمودارهای مربوطه از LightCycler Relative Quantification Software استفاده شد.

داده‌های مربوط به تغییر بیان ژن rmtB با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ با فرض کارایی ۱۰۰ درصد و با استفاده از آزمون آماری T مستقل در دو گروه تحلیل شد.

جدول ۲- مشخصات ترموسایکلر در Real-Time PCR

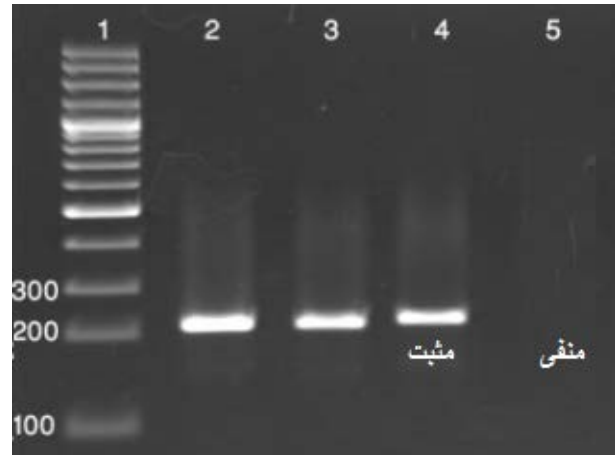
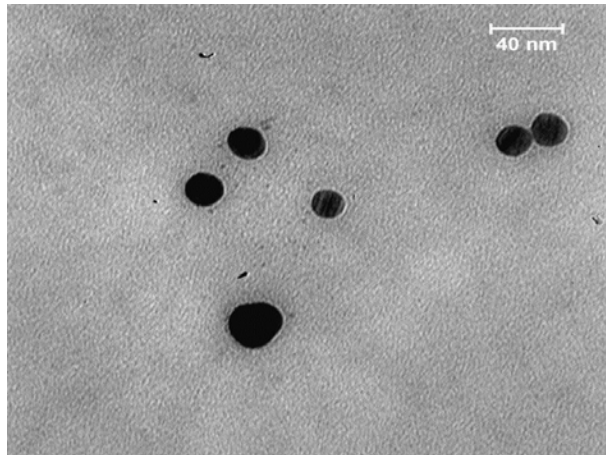
مدت زمان	درجه حرارت (°C)	مرحله	شماره
۳۰ ثانیه	۹۴	واسرشته‌شدن اولیه	۱

¹ Genet bio CAT. NO: Q9210

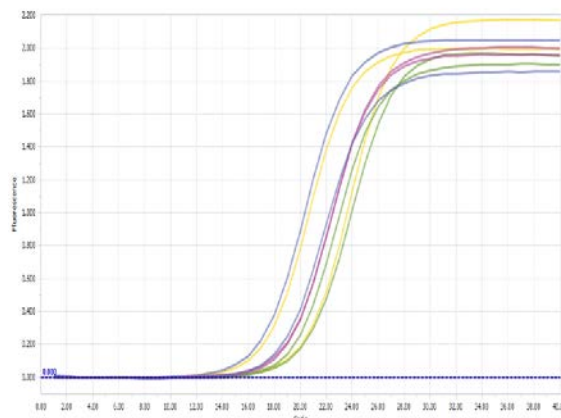
و سنتز cDNA بیان ژن به صورت کمی در دو گروه سلولی تیمار شده و تیمار نشده با استفاده از آنالیز منحنی ذوب و منحنی تکثیر بررسی شد. این مرحله هفت تکرار داشت (شکل‌های ۳ و ۴)، در تمامی تکرارها، میزان بیان ژن *rmtB* در نمونه‌های تیمار شده نسبت به نمونه تیمار نشده تغییر معنادار داشت و بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از سنجش بیان ژن، اختلاف آماری معنادار در بیان ژن در بین دو گروه وجود داشت ($P < 0.05$).

ذرات تولیدی، بیشتر شکل کروی با اندازه ۲۰/۳۹ تا ۳۳/۳۵ نانومتر و تعداد بسیار کمی به صورت مربعی یا میله‌ای هستند (شکل ۲). همچنین نتایج پراش اشعه ایکس (xrd) با طول موج ۱،۵۴۱۸۷۴ Å نشان داد که اکثر نانوذرات شکل کروی داشتند و چهار پیک جذبی در آن‌ها تشخیص داده شد که در محدوده شناسایی نانوذرات نقره قرار داشت.

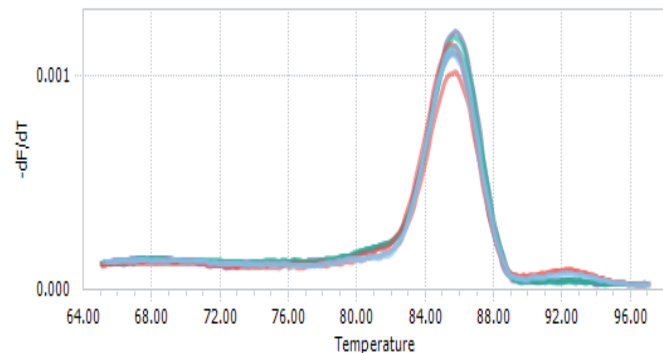
بیان ژن *rmtB* بعد از تیمار با مهارکننده نانوذره نقره: برای مقایسه اثر نانوذره نقره بر بیان ژن *rmtB*، بعد از استخراج RNA



شکل ۱- نتایج الکتروفورز حاصل تکثیر ژن *rmtB* (از چپ به راست: مارکر، کنترل مثبت، نمونه‌های مثبت حاوی ژن *rmtB*، طول قطعه مورد نظر ۲۰۰ جفت باز است).

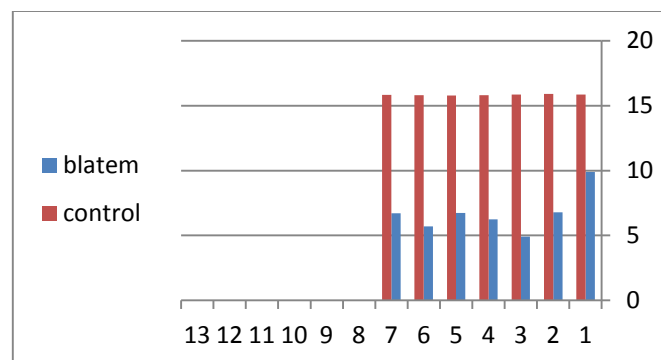


شکل ۴- نتایج منحنی تکثیر محصول در Real time PCR بر حسب سیکل.



شکل ۳- آنالیز منحنی ذوب (Melting curve) برای اطمینان از اختصاصی بودن قطعه‌های تکثیر شده ژن *rmtB* که منحنی ژن مورد سنجش در تمام نمونه‌ها با هم منطبق و به صورت یک قله است.

مقاومت به آمیکاسین را ۵۸/۱۴ درصد گزارش کردند که مشابه تحقیق حاضر است (۱۶). همچنین شاهچراغی و همکاران در سال ۲۰۰۳ در بیمارستان سوانح سوختگی شهید مطهری درصد مقاومت نسبت به جنتامایسین آمیکاسین سیپروفلوکساسین ترتیب به، ۹۳/۷، ۹۳/۴ و ۸۶/۷ درصد گزارش کردند که در مقایسه با مطالعه حاضر مقاومت مشابهی مشاهده می‌شود (۱۷). در باره اینکه چطور باکتری سودوموناس آئروژینوزا مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدها را کسب می‌کند مطالعه‌های زیادی انجام شده است، سودوموناس آئروژینوزا با تولید آنزیم‌های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها^۱ با مکانیسم اضافه کردن گروه‌های استیل، فسفات یا آدنیل به ساختار این آنتی‌بیوتیک‌ها، ساختمان و در نتیجه عملکرد آن‌ها را تغییر می‌دهد (۱۸). در مقایسه با سایر آمینوگلیکوزیدها، آمیکاسین و توبرامایسین به طور معمول سوپستراهای ضعیفی برای این آنزیم‌ها هستند و از این رو فعالیت آنتی‌بیوتیکی بهتری را در مقابل سودوموناس آئروژینوزا ارائه می‌دهند. از سوی دیگر، تغییر در ساختار ریبوزوم که مکان هدف این آنتی‌بیوتیک‌هاست و کاهش نفوذپذیری باکتری به این عوامل ضد میکروبی از دیگر عوامل مقاومت در سودوموناس آئروژینوزا به شمار می‌روند (۱۸ و ۱۹). با توجه به این مطالعه‌ها می‌توان نتیجه گرفت میزان حساسیت به توبرامایسین در حد قابل قبولی است. در مطالعه‌ای که توسط طباطبایی و همکاران انجام شد، اثر ضد میکروبی جنتامایسین علیه سودوموناس آئروژینوزا پس از آمینوگلیکوزیدهای توبرامایسین و آمیکاسین قرار داشت که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت ندارد (۲۰). درصد مقاومت چند دارویی در مطالعه حاضر ۷۶ درصد بود که حدود چهار برابر میزان گزارش شده در مطالعه‌های مشابه است (۲۱). در اروپا، گزارش مرکز کنترل بیماری‌های اروپا^۲ که در سال ۲۰۱۶ منتشر شد نشان داد که ۳۳/۹ درصد از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا حداقل به یکی از گروه‌های ضد میکروبی آمینوگلیکوزیدها و کاربابن‌ها مقاوم هستند (۲۲) از سوی دیگر، خسروی و همکاران در سال ۱۳۹۶ تیپ‌بندی ژنتیکی ۶۶ سویه مقاوم به آنتی‌بیوتیک سودوموناس آئروژینوزا را که از نمونه‌های عفونی زخم و سوختگی جداسازی شده بودند، به روش ERIC-PCR انجام دادند. در این مطالعه هشت خوشه به



شکل ۵- نمودار مقایسه میزان بیان ژن rmtB در هفت سویه بیمار شده با نانوذرات نقره با نمونه کنترل (سوسپانسیون فاقد نانوذرات) ($P < 0.05$).

بحث

تحقیق نشان داد که ارزیابی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، با روش انتشار دیسک نشان داد که ۵۱ نمونه به بیش از دو آمینوگلوکوزید مقاوم بودند. ارزیابی فنوتیپی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به آمینوگلوکوزید نشان داد که ۶۱ درصد به آمیکاسین، ۸۴ درصد به جنتامایسین و ۲۳ درصد به توبرامایسین مقاومت داشتند. از ۵۳ نمونه، ۷۶ درصد به هر سه آمینوگلیکوزید بررسی شده مقاوم بودند. در مطالعه حاضر مقاومت به آمیکاسین و توبرامایسین کمتر بود، در حالی که در مطالعه سال ۲۰۱۵ مقاومت بالا به آمیکاسین (۹۰ درصد) و توبرامایسین (۸۹ درصد) در سودوموناس آئروژینوزا گزارش شده است (۱۳). تاکنون در جهان موفقیت لازم برای کنترل عفونت باکتری سودوموناس آئروژینوزا حاصل نشده است (۱۱). زیرا مقاومت چند دارویی این باکتری، درمان آنتی‌بیوتیکی را با شکست مواجه می‌کند (۱۲). و این مقاومت دارویی در سودوموناس آئروژینوزا در حال افزایش است (۱۱). همچنین مطالعه سال ۲۰۱۲ که در نپال توسط چند و همکاران انجام شد، مقاومت به آمیکاسین ۲۵ و به سیپروفلوکساسین ۷۵ درصد گزارش شد که مقدار مقاومت به آمیکاسین کمتر از مطالعه حاضر است (۱۴). در سال ۲۰۱۴ در گیلان، شیرانی و همکاران مقاومت به توبرامایسین را ۲۱ درصد، آمیکاسین را ۱۱ درصد و جنتامایسین را ۹۷ درصد گزارش کردند (۱۵). مقاومت‌های به وجود آمده نسبت به جنتامایسین و توبرامایسین از این مطالعه با نتیجه به دست آمده این تحقیق مشابه است. کیان‌پور و همکاران در اصفهان (سال ۸۹) میزان

¹ AME: Aminoglycosides Modifying Enzyme

² ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control)

نقش مهارکنندگی روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا داشته باشند (۳۴).

مطالعه‌های زیادی در سال‌های اخیر نشان داده است که نانوذرات نقره در کنترل عفونت باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا که دارای مقاومت چند دارویی شده‌اند مؤثر هستند (۳۵،۳۶،۳۷،۳۸،۳۹،۴۰) و این نتایج با نتیجه تحقیق حاضر همخوانی و مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

اثر نانوذرات نقره بر بیان ژن rmtB در باکتری سودوموناس آئروژینوزا مؤثر است و بیان ژن rmtB را کاهش می‌دهد.

تشکر و قدردانی

- بدین‌وسیله از سرکار خانم بهاره سرگزی که در تمام مراحل اجرای پایان نامه، مشاور طرح بوده‌اند و سرکار خانم فائزه غلامی بهار و آقای علی قرایی و تمامی کارشناسان محترم آزمایشگاه گروه زیست‌شناسی برای همکاری در تمام مراحل سپاسگزاری می‌شود.

- این مطالعه حاصل بخشی از پایان نامه شماره ۱۶۱۵۹۵ آقای باقر الخیکانی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی سلولی و ملکولی از دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد بود.

ملاحظات اخلاقی

- پژوهش حاضر مطابق با پروتکل کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد با کد اخلاق IR.IAU.MSHD.REC.1400.027 انجام شده است.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافی را گزارش نکرده‌اند.

دست آمد. نتایج این مطالعه نشان داد که الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در خوشه‌های مختلف، متفاوت است (۲۳). Warren و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی ۴۹ سویه سودوموناس آئروژینوزای جداشده از ریه بیماران مبتلا به CF به روش rep-PCR پرداختند و سویه‌ها را از نظر مقاومت به آنتی‌بیوتیک مطالعه کردند و نتیجه گرفتند که میزان جهش و انتقال افقی ژن‌ها در این سویه‌ها با قدرت آنها در سازگاری با ریه بیماران مبتلا به CF ارتباط مستقیم دارد (۲۴).

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی نسبت به آمینوگلوکوزیدها دارند و در ایزوله‌هایی که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلوکوزید مختلف مقاومت داشتند، بیان ژن rmtB مشاهده شد.

مطالعه‌های گذشته نشان داده است که نانوذرات فلزی مانند نانوذرات نقره به دلیل داشتن خاصیت ضد میکروبی می‌توانند جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشند (۲۶،۲۵) و نتایج این بررسی این رویکرد را تایید می‌کند. نانوذرات نقره در این پژوهش توانستند روی بیان ژن‌های rmtB تغییر معنادار ایجاد کنند. Jacouton و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که نانوذرات نقره به عنوان عوامل ضد اکتربایی در درمان بیماری‌های عفونی، درهم شکستن مقاومت چند دارویی برای بسیاری از باکتری‌های پاتوژن انسانی مفید هستند (۲۷). مطالعاتی در Mamonova و همکارانش در سال ۲۰۲۰ و Namasivayam سال ۲۰۱۳ نشان داد که نانوذرات آنتی‌بیوتیک‌های نسل آینده هستند و نسبت به فلزات سمیت بسیار پایینی دارند (۲۹،۲۸). نتایج تحقیق رشید و همکارانش در سال ۲۰۲۱ نیز مؤید سودمندی نانوذرات نقره در مهار باکتری‌های پاتوژن انسانی بوده است (۳۰).

همچنین دودی و همکارانش نشان دادند که نانوذرات در باسیل‌های گرم منفی بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام با طیف گسترده از جمله سودوموناس آئروژینوزا بزرگ‌ترین قطر هاله عدم رشد را دارند (۳۱). این نتیجه برای سایر نانوذرات و تاثیر آنها روی مهار باکتری سودوموناس آئروژینوزا انجام شده است. نانوذرات روی و اکسید روی هم می‌توانند مانع رشد سودوموناس آئروژینوزا باشند (۳۲ و ۳۳) و نانوذرات آهن هم با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌توانند

References

- 1- Grosjean M, Guénard S, Giraud C, Muller C, Plésiat P and Juarez P. Targeted Genome Reduction of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 Led to the Development of Hypovirulent and Hypersusceptible rDNA Hosts. *Front. Bioengineering. Biotechnology*. 2021; 9:640-650.
- 2- Bitsori M, Maraki S, Koukouraki S, Galanakis E. *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infection in children: risk factors and outcomes. *The Journal of urology*. 2012 Jan;187(1):260-4.
- 3- Behzadi P, Baráth Z, Gajdács M. It's not easy being green: A narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*. 2021 Jan;10(1):42.
- 4- Rossi E, La Rosa R, Bartell JA, Marvig RL, Haagenen JA, Sommer LM, Molin S, Johansen HK. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. *Nature Reviews Microbiology*. 2021 May;19(5):331-42.
- 5- Spervovasilis N, Psychogiou M, Poulakou G. Skin manifestations of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2021 Apr 1;34(2):72-9.
- 6- Atassi G, Scheetz MH, Nozick S, Rhodes NJ, Murphy-Belcaster M, Murphy KR, Ozer EA, Hauser AR. Genomics of Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections at a United States Academic Hospital. *medRxiv*. 2021 Jan 1.
- 7- Nafplioti K, Souli M, Adamou P, Moraitou E, Giannopoulou P, Chra P, Damala M, Vogiatzakis E, Trikka-Graphakos E, Baka V, Prifti E. Characterization of 16S rRNA methylase genes in Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* in Athens Metropolitan area, 2015–2016. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2021 Jan;40(1):111-21.
- 8- Albadiri V, Molavi F, Tehranipoor M. 2021. The effect of silver nanoparticles on blaTEM gene expression in beta-lactamase-resistant samples in *Escherichia coli*. *Biology journal. of Microorganism*. 2021;39(2):87-100.
- 9- Annear D, Black J, Govender S. Multilocus sequence typing of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients presenting at port Elizabeth hospitals, south Africa. *Afr J Infect Dis*. 2017;11(2):68-74.
- 10- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th ed. CLSI supplement M100S. CLSI, PA. 2018;38-40.
- 11- Portelinha J, Angeles-Boza AM. The antimicrobial peptide Gad-1 clears *Pseudomonas aeruginosa* biofilms under cystic fibrosis conditions. *ChemBioChem*. 2021 May 4;22(9):1646-55.
- 12- Bobrov AG, Getnet D, Swierczewski B, Jacobs A, Medina-Rojas M, Tyner S, Watters C, Antonic V. Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and therapeutics in military-relevant animal infection models. *APMIS*. 2021 Jun 15.
- 13- Heera R, Sivachandran P, Chinni SV, Mason J, Croft L, Ravichandran M, et al. Efficient extraction of small and large RNAs in bacteria for excellent total RNA sequencing and comprehensive transcriptome analysis. *BMC Res Notes*. 2015;8(1):754.
- 14- Shander RM, Anil C. Antimicrobial Susceptibility Patterns of *pseudomonas aeruginosa* clinical isolates at tertiary care hospital in kathmando, nepal. *Asian J Pharm Clin Res* 2013 ;6(3): 235-238.
- 15- Salimi chirani A, Dabiri H, Nikokar I, Ebrahim pour komleh M, Dousdar F, Goudarzi H, et al. Evaluation of type IV pilin sub groups in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from environmental samples, cystic fibrosis and burn patients. *Iran J Med Microbiol*. 2014; 8 (3) :1-7
- 16- Kianpoor F, Khosravi A. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo beta lactamases from infections in burned patients and identification of blaIMP and blaVIM genes by PCR. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2007;1(1):23-31.
- 17- Shahcheraghi F, Faizabadi MM, Yamin V, et al. Serovar determination, drug resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* from burn patients at two hospitals of Tehran. *Burns* 2003; 29(6): 547-551.
- 18- Fournier D, Carrière R, Bour M, Grisot E, Triponney P, Muller C, Lemoine J, Jeannot K, Plésiat P, GERPA Study Group. Mechanisms of Resistance to Ceftolozane/Tazobactam in *Pseudomonas aeruginosa*: Results of the GERPA Multicenter Study. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2021 Jan 20;65(2):e01117-20.
- 19- Plant AJ, Dunn A, Porter RJ. Eroa-it. Ceftolozane-tazobactam resistance induced in vivo during the treatment of MDR *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2018;16(5):367-8.
- 20- Siasi E, Rafiei Tabatabaie R, Moslehi Mehr F. Isolation of bla_vim gene in Antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospitals. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*. 2018;8(29):97-106
- 21- Kato K, Iwai S, Kumasaka K, Horikoshi A, Inada S, Inamatsu T, et al. Survey of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by The Tokyo Johoku

Association of *Pseudomonas* Studies. J Infect Chemother 2001; 7(4): 258-62.

22- Pedersen SS, Kharazmi A, Espersen F, et al. *Pseudomonas aeruginosa* alginate in cystic fibrosis sputum and inflammatory response. Infect Immun 1990; 58(3): 3363 – 3368.

23- Pool k. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 2000;44(22):33–41.

23- Cavallo JD, Fabre R, Leblanc F, Nicolas-Chanoine MH, Thabaut A. Antibiotic susceptibility and mechanisms of betalactam resistance in 1310 strains of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study (1996). J Antimicrob. Chemother 2000; 46(1): 133-6

24- Shawar RM, Macloed DL, Garber RL, Burns et al. Activation of Tobramycin and six other antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with Cystic fibrosis. Antimicrobial Agent and chemotherapy 1999;12(2):2877-88.

25- Arya S, Sonawane H, Math S, Tambade P, Chaskar M, Shinde D. Biogenic titanium nanoparticles (TiO₂ NPs) from *Tricoderma citrinoviride* extract: synthesis, characterization and antibacterial activity against extremely drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. International Nano Letters. 2021 Mar;11(1):35-42.

26- Khare T, Mahalunkar S, Shriram V, Gosavi S, Kumar V. Embelin-loaded chitosan gold nanoparticles interact synergistically with ciprofloxacin by inhibiting efflux pumps in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Environmental research. 2021 Aug 1;199:111321.

27- Jacouton E, Chain F, Sokol H, Langella P, Bermudez-Humaran LG. Probiotic Strain *Lactobacillus Casei* BL23 Prevents Colitis-Associated Colorectal Cancer. Frontiers in Immunology. 2017; 8:1553

28- Namasivayam SK, Venkatachalam G, Bharani RA. Immuno biocompatibility and anti-quorum sensing activities of chitosan-gum acacia gold nanocomposite (CS-GA-AuNC) against *Pseudomonas aeruginosa* drug-resistant pathogen. Sustainable Chemistry and Pharmacy. 2020 Sep 1;17:100300.

29- Mamonova IA, Matasov MD, Babushkina IV, Losev OE, Chebotareva YG, Gladkova EV, Borodulina YV. Study of physical properties and biological activity of copper nanoparticles. Nanotechnologies in Russia. 2013 May;8(5):303-8.

30- Rashid A, Molavi F, Mahmoudzadeh H. The effect of silver nanoparticles on *mecA* gene expression in methicillin-resistant samples of *Staphylococcus aureus*. NCMBJ. 2020; 11 (41) :67-82.

31- 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. 2011.44(2):5:51-44.

32- 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.

33- 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.

34- Haney CE. Effects on Iron Nanoparticles on *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms: University of Dayton; 2011, 322PP.

35- de Lacerda Coriolano D, de Souza JB, Bueno EV, Medeiros SM, Cavalcanti ID, Cavalcanti IM. Antibacterial and antibiofilm potential of silver nanoparticles against antibiotic-sensitive and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. Brazilian Journal of Microbiology. 2021 Mar;52(1):267-78.

36- Ulagesan S, Nam TJ, Choi YH. Biogenic preparation and characterization of *Pyropia yezoensis* silver nanoparticles (Py AgNPs) and their antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2021 Mar;44(3):443-52.

37- Pandian M, Selvaprithviraj V, Pradeep A, Rangasamy J. In-situ silver nanoparticles incorporated N, O-carboxymethyl chitosan based adhesive, self-healing, conductive, antibacterial and anti-biofilm hydrogel. International journal of biological macromolecules. 2021 Oct 1;188:501-11.

38- Haidari H, Kopecki Z, Sutton AT, Garg S, Cowin AJ, Vasilev K. pH-Responsive “Smart” Hydrogel for Controlled Delivery of Silver Nanoparticles to Infected Wounds. Antibiotics. 2021 Jan;10(1):49.

39- Shahbandeh M, Eghdami A, Moghaddam MM, Nadoushan MJ, Salimi A, Fasihi-Ramandi M, Mohammadi S, Mirzaei M, Mirnejad R. Conjugation of imipenem to silver nanoparticles for enhancement of its antibacterial activity against multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Biosciences. 2021 Dec;46(1):1-9.

40- Ansari MA, Asiri SM, Alzohairy MA, Alomary MN, Almatroudi A, Khan FA. Biofabricated Fatty Acids-Capped Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial, Antifungal, Antibiofilm and Anticancer Agents. Pharmaceuticals. 2021 Feb;14(2):139.