

اثرات مهارى نانوذرات نقره بر بیان ژن ایجاد کننده بیوفیلیم (bap) در سویه های اسینتوباکتر بومانی مقاوم به آنتی بیوتیک با استفاده از روش Real Time PCR

توحید پیری قراقیه^۱، سید عطاله سادات شانديز^{۲*}

(۱) گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

(۲) گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۲۱

چکیده

مقدمه: اسینتوباکتر بومانی یکی از عوامل پاتوژن شایع بیمارستانی است که به دلیل تولید بیوفیلیم به بسیاری از آنتی بیوتیک ها مقاوم شده و درمان آن را مشکل ساخته است. امروزه، نانوذرات نقره به دلیل داشتن ویژگی های شیمیایی و فیزیکی مناسب، در پزشکی کاربردهای گسترده ای دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضدبیوفیلیمی نانوذرات نقره بر روی ایزوله های مقاوم به آنتی بیوتیک اسینتوباکتر بومانی می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، سویه های اسینتوباکتر بومانی از ۱۰۰ نمونه بالینی جداسازی شدند. بعد از شناسایی سویه های اسینتوباکتر بومانی و تعیین مقاومت میکروبی آن ها، توانایی تشکیل بیوفیلیم سویه ها با کمک روش کشت کنگو رد آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان MIC (Minimum Inhibitory Concentration) سویه ها علیه نانوذرات نقره تعیین شد، تیمار سویه ها با غلظت زیر حدمهارکنندگی (SubMIC) انجام شد و استخراج RNA و سنتز cDNA انجام گرفت. در نهایت، ارزیابی بیان ژن تشکیل بیوفیلیم Bap با استفاده از روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته های پژوهش: از میان ۱۰۰ نمونه بالینی، ۱۲ نمونه مربوط به اسینتوباکتر بومانی بودند که به تمامی آنتی بیوتیک ها به جز کلیستین مقاوم بودند. نتایج PCR نشان داد که تمامی ۱۲ سویه دارای ژن تشکیل بیوفیلیم Bap بودند. نتایج Real Time PCR نشان داد که به دنبال تیمار سویه ها با غلظت SubMIC نانوذرات نقره، تمامی سویه ها دارای کاهش بیان معناداری در ژن Bap ($P < 0.05$) نسبت به ژن کنترل بودند.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به اثرات ضد بیوفیلیمی نانوذرات نقره، به نظر می رسد نانوذرات نقره می تواند به عنوان یک کاندید دارویی در صنایع داروسازی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: اسینتوباکتر بومانی، بیوفیلیم، Bap، نانوذرات نقره

*نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

Email: Ata.sadatshandiz@iauctb.ac.ir

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

اسينتوباکترى بوماني پاتوژن فرصت طلبى است که همواره به عنوان يکى از مهم ترين عوامل بيمارى زاي عفونت هاى بيمارستانى شناسايى شده است (۱،۲). يکى از مشکلات عمده در درمان و پيشگيرى از عفونت هاى ايجاد شده توسط اسينتوباکترى بوماني، مقاومت هاى آنتى بيوتىکى ايجاد شده در آن مى باشد. اسينتوباکترى بوماني مقاومت چند دارويى ايجاد مى کند که اين پديده توسط انواع مقاومت هاى آنتى بيوتىکى مختلف ثابت شده است از جمله فعال سازى پمپ هاى افلاکس، توليد آنزيم هاى بتالاکتاماز، کاهش نفوذپذيرى غشاي خارجى، سنتز آنزيم هاى مثل فسفريل ترانسفرازها و استيل ترانسفرازها که باعث مقاومت به آمينو گليکوزيدها مى شود. علاوه بر موارد ذکر شده مکانيسم ديگرى در مقاومت آنتى بيوتىکى اسينتوباکترى بوماني تحت عنوان بيوفيلم وجود دارد (۳). بيوفيلم ها اجتماعات پيچيده باکترىايى متصل به سطوح هستند که توسط يک ماتريکس خارج سلولى توليد شده توسط باکترى ها ايجاد مى شوند. اين ماتريکس از پلي ساکاريدها، DNA و پروتئين ها تشکيل شده است (۴). بيوفيلم هاى باکترىايى مشکلات بسيارى را در زمينه پزشکى، صنعتى و محيطى ايجاد مى کنند. چسبیدن باکترى ها به سطوح مسئله مهمى در اکولوژى، بيوتکنولوژى، آلودگى زيستى و تيمار فاضلاب است (۵). پروتئين هاى مختلفى در ايجاد اين مقاومت تاثير گذارند که از اين بين مى توان به پروتئين هاى ايجادکننده و تقويت کننده ساختار بيوفيلم اشاره کرد. اولين عضو اين گروه از پروتئين ها با عنوان BAP در باکترى اسينتوباکترى بوماني شناسايى شده است. اين پروتئين در سطح خارجى باکترى ها قرار دارند. شامل هسته مرکزى متشکل از تکرارهاى متوالى از توالى هاى مشابه هستند. به باکترى قابليت تشکيل بيوفيلم مى دهند به اين ترتيب نقش مهمى در عفونت زاي پاتوژن ها دارند (۶). امروزه محققان در حال جستجوى راه حل هاى جديد براى درمان باکترى هاى مقاوم به دارو هستند. يکى از زمينه هاى کاربردى

نانوبيوتکنولوژى استفاده از نانوذرات در درمان عفونت هاى ميكروبي مى باشد (۷). از زمان باستان خواص ضد ميكروبي نقره شناخته شده است ولى اخيراً به دليل ساخته شدن نقره به صورت نانوذرات، سطح تماس افزايش يافته و خاصيت ضد ميكروبي آن تا بيش از ۹۹ درصد افزايش يافته است (۸). نقره در ابعاد بزرگتر فلزى خاصيت واكنش دهى كمى دارد، ولى زمانى که به ابعاد كوچك تر در حد نانومتر تبديل مى شود، خاصيت ميكروب كشى آن افزايش مى يابد، به همين دليل در پزشكى به بررسى اثرات آن اهميت داده مى شود (۹). نانوذرات نقره به علت داشتن بار سطحى و نسبت سطح به حجم بالاى خود، آنزيم ها و DNA ميكروارگانيسم ها را با تعادل الكترون بين گروه هاى دهنده الكترون مثل تيول، كركوسيلات، آميد، ايميدازول، اندول و هيدروكسيل غير فعال مى سازند. تغييرات ضد ميكروبي که از رشد باکترى بيمارىزا ممانعت مى کنند، يک هدف مطلوب محسوب مى شود (۱۰). از آن جا که در زمان تشکيل بيوفيلم باکترى هزينه هاى درمان بالا رفته و گران بودن درمان هاى فعلى براى درمان بيوفيلم آن و هم چنين عدم کارايى كافى درمان هاى موجود، استفاده از نانوذرات نقره براى درمان مى تواند راهکار مناسبى تلقى گردد. به دليل مقاومت هاى آنتى بيوتىکى اسينتوباکترى بوماني، کلاس هاى كمى از آنتى بيوتىک ها مى توانند براى درمان عفونت هاى ناشى از اين باکترى مورد استفاده قرار گيرند. به همين دليل ايمى پنم ها و کارباپنم ها يکى از مهم ترين آنتى بيوتىک هاى مورد استفاده مى باشند. اين آنتى بيوتىک ها آخرين خط درمانى در درمان عفونت هاى ناشى از باکترى هاى گرم منفى، از جمله اسينتوباکتر بوماني مى باشند. از اين رو اصلى ترين مقاومت به کارباپنم ها را مى توان در بيان ژن هاى Bap جستجو کرد (۱۱). اسينتوباکترى بوماني با بيان ژن Bap سبب کاهش نفوذپذيرى و در نتيجه ايجاد مقاومت به کارباپنم ها مى شود و علاوه بر آن با چسبندگى بالايى که با سطح زنده و غيرزنده ايجاد مى کند موجب پايدارى بالايى عامل بيمارىزا مى شود (۱۲). هدف از اين مطالعه بررسى

تأثیر نانوذرات نقره بر میزان ژن BAP می باشد که در ایجاد بیوفیلیم در سویه های مقاوم به داروی اسیتوباکتر بومانی می باشد.

مواد و روش ها

تهیه نانوذرات نقره: نانوذره نقره خریداری شده از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان دارای متوسط اندازه ۲۰ نانومتر، ۹۹/۹۹ درصد خلوص و از شرکت آمریکایی US Nano بود.

جمع آوری /یزوله های باکتریایی: در این پژوهش طی سال های ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۶، طی مدت پنج ماه، تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی مشکوک به اسیتوباکتر از بیمارستان شهید چمران شهر تهران جمع آوری شد و در محیط کشت مولر هیتتون آگار کشت داده شد. سپس نمونه های اسیتوباکتر روی محیط های کشت بلاد آگار و مک کانکی آگار کشت داده شدند. سپس محیط های کشت به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور نگهداری شدند. برای نگهداری باکتری ها، آن ها را در محیط کشت مایع حاوی گلیسرول تلقیح و سپس در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

تست حساسیت آنتی بیوتیکی: جهت انجام کشت آنتی بیوگرام یا تست حساسیت میکروبی از روش استاندارد دیسک دیفیوژن (Clinical and Laboratory Standard Institute) استفاده شد. دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده در این مطالعه از شرکت MAST تهیه شد که شامل ایمپی پنم (۱۰ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، سیپروفلوکسازین (۵ µg)، سفتازیدین (۳۰ µg)، ایمیکاسین (۳۰ µg)، پیپرسیلین تازوباکتام و کولیسین (۱۰ µg) بود.

تست فنوتیپی تشخیص بیوفیلیم: در این تست از روش مورد استفاده در تست فنوتیپی فریمن و همکاران با استفاده از محیط کشت کونگو رد آگار انجام گرفت (۱۳). این محیط کشت حاوی محیط BHI (g/L) ۳۷، آگار (g/L) ۱۰، سوکروز (g/L) ۵۰ و رنگ کونگو رد (g/L) ۰/۸ می باشد. سویه های بالینی اسیتوباکتر بومانی در پلیت حاوی محیط کشت کونگو رد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت

کشت داده شدند. باکتری های تولیدکننده بیوفیلیم کلنی های مشکی رنگ و سایر باکتری ها کلنی های قرمز رنگ تشکیل می دهند.

آزمون میکرودایلوشن براث برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC): برای تعیین MIC از روش رقت گیری سریالی به صورت سه تکرار در محیط کشت انجام شد. بدین صورت که رقت های مختلف از ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی لیتر از نانوذرات نقره به چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به هر چاهک اضافه شد و پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شب در گرمخانه تیمار شدند. یک چاهک به عنوان بلانک (محیط کشت خالی و باکتری اسیتوباکتر بومانی بدون تیمار با نانوذرات) استفاده شد. نهایتاً، کدورت تمام چاهک ها با استفاده از دستگاه قرائت گر الایزا در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانش شدند.

بررسی کمی اثرات ضدبیوفیلیمی نانوذرات نقره: اثرات کمی ضدبیوفیلیمی نانوذرات نقره با استفاده از روش میکروتیتر پلیت و با غلظت ۵۰ میکرولیتر زیرحد کشندگی نانوذرات استفاده شد. سنجش کمی بیوفیلیم به وسیله افزودن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ درصد به هر چاهک صورت گرفت و جذب آن در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه ELISA Reader خوانده شد.

بررسی بیان ژن *bap* به کمک *Real-Time PCR*: استخراج RNA از باکتری اسیتوباکتر بومانی به منظور بررسی بیان ژن های AB-16S- rRNA و BAP پس از تیمار با غلظت subMIC نانوذرات نقره صورت گرفت. استخراج RNA توسط دستورالعمل تهیه شده از شرکت کیاژن (کیاژن، آمریکا) انجام گرفت. غلظت RNA مورد استفاده حدود ۱ تا ۲ میکروگرم در نظر گرفته شد. برای این منظور، جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. هم چنین جذب نوری در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر برای اطمینان از عدم آلودگی پروتئینی و جذب نوری در طول موج ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر برای اطمینان از عدم آلودگی نمک و سایر مواد آلی سنجیده شد که برای

تیمار شده توسط دستگاه نانو دراپ، مطابق با کیت فرمنتاز (Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit) انجام گرفت.

RNA، این نسبت جذب برابر با ۲ قبول بود. ساخت cDNA از روی RNA استخراج شده، پس از تعیین مقدار و غلظت RNA حاصل از سلول های بیوفیلم مثبت اسیتوباکتر بومانی

جدول شماره ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در PCR

ژن هدف	توالی ها	محصول (جفت باز)	دمای اتصال
BAP	F 5'-TAGACGCAATGGATAACG-3' R 5'-TTAGAACCGATAACGATACC-3'	۱۲۷	۶۱
16S rRNA	F 5'-TATCAGGACCATCTGGAGTAGG-3' R 5'-CATCAACTTCACCTTCACGC-3'	۱۱۰	۶۰

اسیتوباکتر بومانی به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. برای هر نمونه، واکنش دو مرتبه انجام گرفته و میانگین مقادیر به دست آمده به عنوان مقدار (کمیت) بیان ژن برای آن نمونه در نظر گرفته شد. از فرمول مرجع نسبی بیان $\Delta\Delta Ct$ برای تعیین بیان ژن مورد نظر استفاده گردید. $\Delta\Delta Ct$ توسط تفریق ΔCt نمونه تیمار شده با نانوذرات نقره از ΔCt نمونه تیمار نشده استاندارد به دست آمد. نسبت ژن هدف (Bap) به ژن مرجع (16S rRNA) از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (۱۷).
آنالیز آماری: در این پژوهش محاسبه آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفت و نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت بیان ژن های هدف، بین نمونه های کنترل و تیمار شده با روش آماری Tukey's HSD post-hoc test محاسبه گردید. اطلاعات به صورت mean±standard deviation (SD) نمایش داده شده اند و مرز معناداری روی $P<0.05$ قرار گرفته شد.

یافته های پژوهش

ایزوله های انتخاب شده و نتایج آنتی بیوگرام باکتری ها: از ۱۰۰ نمونه جمع آوری شده ۱۲ نمونه اسیتوباکتر بومانی از بیماران بستری به دست آمد که بر اساس نوع نمونه انتخاب شد و شامل: ۳ نمونه زخم، ۱ نمونه خون، ۴ نمونه پوست و ۲ نمونه ادرار و ۲ نمونه تراشه بود.

نتایج حاصل از تست حساسیت میکروبی مطابق جدول شماره ۲ نشان داد که اسیتوباکترهای جداسازی شده به تمام آنتی بیوتیک های ایمی پنم، جنتامایسین، سیپروفلوکسازین، سفتازیدین، ایمیکاسین، پیپرسیلین،

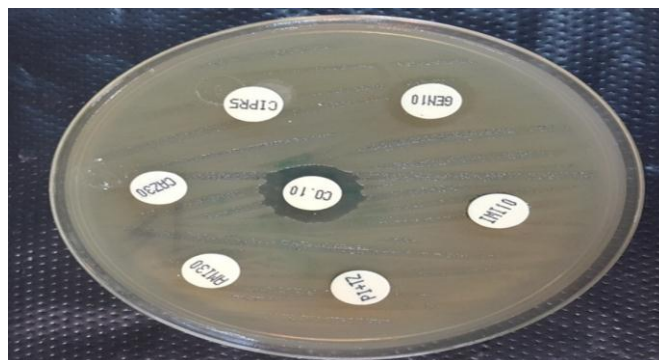
در این پژوهش برای انجام تست RealTime PCR از مسترمیکس حاوی سایبر گرین SYBER green (Applied Biosystem، انگلستان) انجام گرفت و ژن 16S rRNA به عنوان ژن مرجع (کنترل داخلی) جهت بررسی بیان ژن bap در باکتری های تیمار شده با نانوذرات نقره بررسی شد. طراحی پرایمرهای این تحقیق با نرم افزار های Primer Express و Gene Runner انجام گرفت. سپس به منظور تایید پرایمرها، با استفاده از توالی های موجود در بانک های ژنی و ابزار آنالین BLAST، صحت پرایمرها انجام شد. در جدول شماره ۱ توالی جفت پرایمرهای جلوبر و برگشتی دو ژن bap و 16S rRNA مشخص شده است.

بر طبق دستورالعمل، مسترمیکس، پرایمرها و cDNA سنتز شده در حجم مناسبی مخلوط شده و توسط دستگاه Bioneerexicycler 96 Real-time PCR واکنش انجام گردید. حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر و شامل ۲ میکرولیتر cDNA، ۱۰ پیکومول از پرایمرهای جلوبر و برگشتی برای هر دو ژن bap و 16S rRNA، ۱۰ میکرولیتر از مسترمیکس Bioneer و ۱۱ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل بود. چرخه دمایی شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ سیکل در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه بود. مرحله نهایی جهت ترسیم منحنی ذوب (Melting Curve) به صورت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. هم چنین از سویه ATCC25923

تازوباکتام مقاوم بودند و تنها آنتی بیوتیکی که باعث از بین رفتن باکتری ها شد کولستین بود.

جدول شماره ۲. نتایج حاصل از تست حساسیت میکروبی

اسینتوباکتر بومانی					
علامت اختصاری	عامل ضد میکروبی	غلظت (میکروگرم)	حساس	حساسیت بینایی	مقاوم
IMI	ایمی پنم	۱۰		۱۵-۱۴	
GEN	جنتامایسین	۱۰		۱۴-۱۳	
CIR	سیپروفلوکسازین	۵		۲۰-۱۶	
CAZ	سفنازیدین	۳۰		۱۷-۱۵	
AMI	آمیکاسین	۳۰		۱۵-۱۴	
PTZ	پیراسیلین-تازوباکتام	-		۲۰-۱۸	
CO	کولستین	۱۰	-	-	-



شکل شماره ۱. تست آنتی بیوگرام اسینتوباکتر بومانی. میزان مقاومت و حساسیت سویه های اسینتوباکتر بومانی به آنتی بیوتیک های مختلف نشان داده شده است.

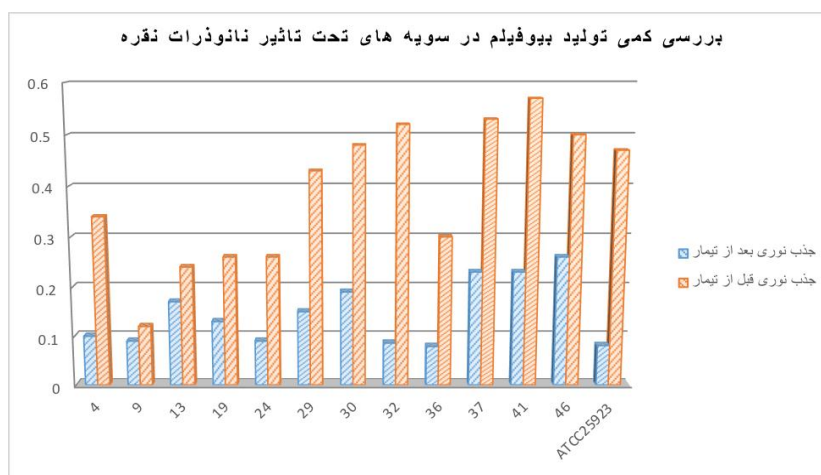
نتایج MIC نانوذرات نقره علیه سویه های بیوفیلم مثبت: سویه های بیوفیلم مثبت تحت تاثیر غلظت های ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از نانوذرات نقره در مدت زمان ۲۴ ساعت قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سویه های مختلف دارای محدوده ای از MIC بودند (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳. تعیین MIC نانوذره نقره در سویه های مختلف اسینتوباکتر بومانی

شماره سویه	MIC (µg/ml)
۴	۶/۲۵
۹	۱۲/۵
۱۳	۵۰
۱۹	۱۲/۵
۲۴	۲۵
۲۹	۱۲/۵
۳۰	۶/۲۵
۳۲	۳/۱۲۵
۳۶	۲۵
۳۷	۶/۲۵
۴۱	۶/۲۵
۴۶	۲۵
ATCC ۲۵۹۲۳	۵۰۰

همان طور که در جدول نشان داده است میزان جذب در تمامی سويه ها بعد تیمار با نانوذرات نقره کاهش زیادی را نشان داد که نشان دهنده کاهش توانایی تشکیل بیوفيلم سلول های باکتریایی و کاهش جذب نوری در نتیجه توانایی کم اتصال به کف میکروپلیت بوده است.

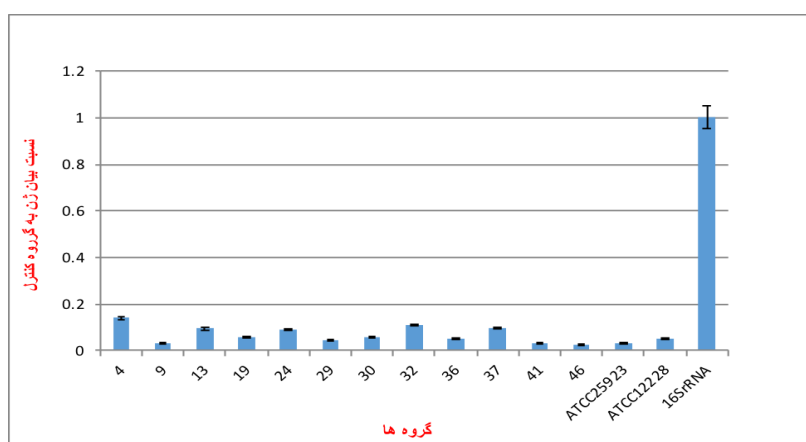
بررسی کمی اثرات ضد بیوفيلمی نانوذرات نقره: ارزیابی کمی اثرات ضد بیوفيلمی نانوذرات نقره با کمک روش میکروتیتريپلست انجام گرفت. نتایج این روش نشان داد که توانایی تشکیل بیوفيلم در تمامی سويه ها در غلظت SubMIC نانوذرات نقره از دست رفته است که در نمودار شماره ۱ مشخص شده است.



نمودار شماره ۱. بررسی کمی تولید بیوفيلم در سويه های تحت تاثیر نانوذرات نقره

سويه های مختلف با دارا بودن MIC های مختلف، تحت تاثیر نانوذرات نقره تغییر بیان مختلفی را داشتند و از نظر آماری تفاوت معناداری در مقایسه با بیان ژن 16S rRNA از خود نشان دادند ($P < 0.05$).

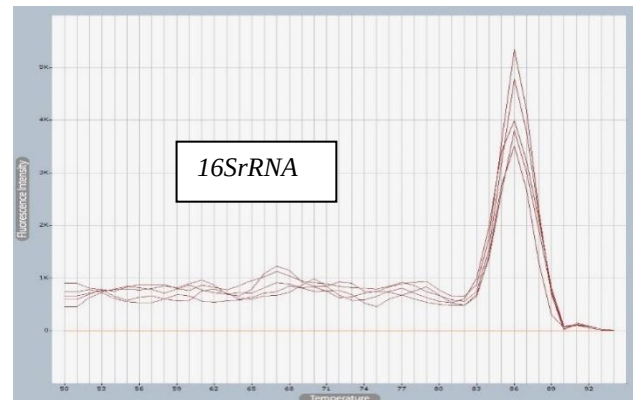
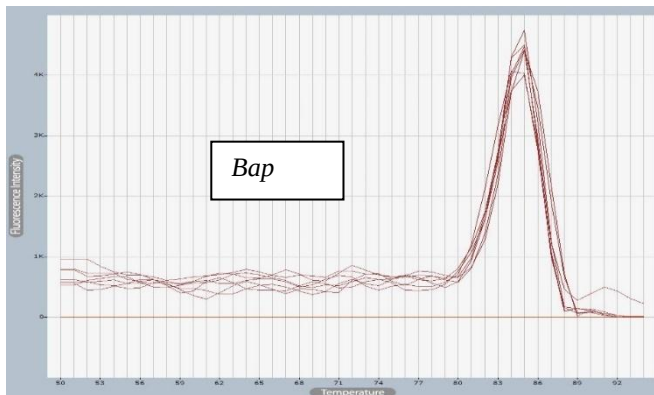
نتایج بررسی بیان ژن bap در سويه های بیوفيلم مثبت در غلظت های subMIC از نانوذرات توسط روش Real Time PCR نتایج حاصل از نسبت بیان ژن bap نسبت به ژن مرجع در سويه های بیوفيلم مثبت در نمودار شماره ۲ آمده است. نتایج نشان داد که



نمودار شماره ۲. میزان بیان ژن bap در سويه های تیمار شده با نانوذرات نقره. همان طور که مشاهده می شود بیان ژن bap در سويه های تیمار شده با نانوذرات نقره در مقایسه با ژن کنترل کاهش معناداری داشته اند.

منحنی ذوب تعیین کننده عدم جفت شدن آغازگرها، تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر و

عدم تکثیر قطعات غیر اختصاصی برای هر ژن را در نمودار شماره ۳ نشان می دهد.



نمودار شماره ۳. الف) الگوی منحنی ذوب ژن 16SrRNA با دمای ۸۵/۸. ب) الگوی منحنی ذوب ژن bap با دمای ۸۴/۹

بحث و نتیجه گیری

اسینتوباکتر بومانی شایع ترین عامل بیماریزای انسانی در جنس اسینتوباکتر می باشد و به عنوان یکی از مهم ترین عوامل عفونت های بیمارستانی به شمار می آید. یکی از مشکلات عمده در درمان و پیشگیری از عفونت های ایجاد شده توسط اسینتوباکتر بومانی، مقاومت های آنتی بیوتیکی ایجاد شده در آن می باشد و کاربایتم ها به آخرین خط درمان در عفونت های ناشی از باکتری های گرم منفی، از جمله اسینتوباکتر بومانی می باشند. اصلی ترین عامل مقاومت به کاربایتم را می توان تولید بیوفیلیم دانست (۱۴). در خصوص مقاومت اسینتوباکتر مطالعات زیادی صورت گرفته که نتایج آن ها برحسب زمان و مکان متفاوت بوده است. بنا بر این از اهداف مهم این تحقیق، بررسی میزان تشکیل بیوفیلیم در سویه های بالینی اسینتوباکتر بومانی مقام به آنتی بیوتیک بوده است. پژوهش بر روی توانایی اتصال، تشکیل بیوفیلیم و ژن های مداخله گر در تشکیل بیوفیلیم در سویه های مختلف اسینتوباکتر بومانی می تواند اطلاعات امیدوارکننده ای در مورد درک بهتر روند پیچیده ایجاد بیوفیلیم و عفونت های ناشی از این ارگانیسم ها فراهم نماید.

در سال های اخیر به دنبال مقاومت و ایجاد پایداری باکتری ها به آنتی بیوتیک ها، دلیل مناسبی برای تحقیق در خصوص ژن بیان کننده بیوفیلیم (Bap) در باکتری های مختلف بوده است. برای مثال، گریگوریو و همکاران در سال ۲۰۱۵ میلادی مطالعه ای در خصوص پروتئین های مربوط به بیوفیلیم اسینتوباکتر انجام دادند. آن ها اعلام نمودند که پروتئین بزرگی به نام BAP در تشکیل بیوفیلیم و چسبیدن اسینتوباکتر بومانی به سلول میزبان نقش دارد. نتایج این گروه نشان داد که به نظر می رسد چندین پروتئین دارای تکرارهای Ig-like در تشکیل بیوفیلیم دخیل باشند (۱۵). می توان گفت محققین بسیاری وجود داشته اند که علاقه به بررسی مقاومت باکتری اسینتوباکتر بومانی به آنتی بیوتیک های مختلف بوده اند. لیهائو کی و همکاران در سال ۲۰۱۶ میلادی مطالعه ای مبنی بر ارتباط بین مقاومت آنتی بیوتیکی، تشکیل بیوفیلیم و مقاومت ویژه بیوفیلیم در اسینتوباکتر بومانی انجام دادند. در مطالعه آن ها ارتباط بین مقاومت آنتی بیوتیکی، تشکیل بیوفیلیم و مقاومت ویژه بیوفیلیم در ایزوله های بالینی اسینتوباکتر بومانی بررسی گردید (۱۶).

عزیزی و همکاران در سال ۲۰۱۶ میلادی مطالعه ای با عنوان آنالیز مولکولی و بیان ژن BAP در اسینتوباکتریومانی تشکیل دهنده بیوفيلم و مقاوم به چند دارو انجام دادند. دستاورد آن ها نشان داد که بیان بیش از حد BAP در تشکیل بیوفيلم در حضور غلظت کم آهن تاثیر گذار است (۱۷).

ریچا سینگ و همکاران در سال ۲۰۱۶ میلادی مطالعه ای مبنی بر نانوذرات برای کنترل عفونت ناشی از بیوفيلم گونه های اسینتوباکتر انجام دادند. در گزارش آن ها به اهمیت نقش نانوذرات مختلف به عنوان عوامل ضد بیوفيلمی در اسینتو باکتر، مواد پوشاننده سطح برای کنترل و درمان بیوفيلم های اسینتوباکتر پرداخته شد و نتیجه مثبت تاثیر نانوذرات بر کاهش تولید بیوفيلم را گزارش نمودند (۱۸).

اسلامی و همکاران در سال ۱۳۹۰ شمسی الگوی حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های اسینتوباکتر جدا شده از نمونه های بالینی بیمارستان آزاد تهران را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج مطالعه این گروه نشان از افزایش مقاومت سویه های اسینتوباکتر نسبت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین و آمیکاسین بود که علت آن را به مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها نسبت دادند (۱۹).

محققان دیگری در صدد بودند تا تاثیر بیوفيلم را در ثبات و بقای باکتری در محیط به خصوص در بیمارستان ها که عاملی برای ايجاد عفونت های بیمارستانی می باشد را نشان دهند. ویدالو همکاران در سال ۱۹۹۶ میلادی در خصوص ساختار بیوفيلم ثابت نمودند که در باکتری اسینتوباکتریومانی سلول های چسبنده ای که با روکش های گوناگونی پوشیده می شوند به شکل حد واسط در شرایط کمبود مواد غذایی تشکیل ساختار بیوفيلم و پایدار می دهد. یافته ها حاکی از افزایش سریع در شمار و تعداد سلول های بیوفيلم و افزایش نسبی در شمار سلول های حاوی مقاومت وجود دارد. این تحقیق ثابت کرد که وجود بیوفيلم در اسینتوباکتر بومانی از این میکروارگانیسم در برابر فاکتورهای گوناگون ضد باکتریایی محافظت می کند (۲۰).

توانایی فوق العاده ی نقره به عنوان عامل ضد میکروبی مسبب استفاده از نانوذرات این ماده در تحقیقات بسیاری از محققان بوده است. تحقیقات مختلفی نشان دادند که نانوذرات توانایی چشمگیری در مهار بیماری های عفونی باکتریایی دارند. طبق تحقیقات هندیانی و همکاران در سال ۲۰۱۵ میلادی درخصوص سنتز نانوذرات نقره و اثرات سینرژیک آن ها در ترکیب با ایمی پنم و دو بیوساید (کشنده زیستی) علیه بیوفيلم تشکیل شده توسط اسینتوباکتریومانی اثرات نانوذرات نقره به تنهایی و در ترکیب با بیوسایدها و ایمی پنم بر ضد بیوفيلم های اسینتوباکتریومانی و فرم پلانکتونی آن انجام گردید. نتیجه و دستاورد تحقیق این گروه بیانگر این نکته بود که نانوذرات نقره به تنهایی می توانند سبب مهار تشکیل بیوفيلم شوند اما اثر آن ها در ترکیب با ایمی پنم بر ضد اشکال بیوفيلم ها و شکل پلانکتونی اسینتوباکتریومانی موثرتر است (۲۱). هندیایی و همکاران در سال ۱۳۹۱ مطالعه ای در خصوص مقایسه فعالیت ضد بیوفيلمی نانوذره نقره و چند ترکیب ضد میکروبی دیگر بر علیه سویه های اسینتوباکتر مولد بیوفيلم انجام دادند. نتایج مطالعه اخیر این بود که استفاده از ترکیبات دارویی با طیف وسیع تر مانند نانوذرات نقره در ترکیب با مواد ضد میکروبی مناسب می تواند باعث کاهش تشکیل بیوفيلم و حذف بیوفيلم های بالغ، کاهش دوز موثر داروها، افزایش کارایی درمان و جلوگیری از تشکیل سویه های مقاوم شود (۲۲).

یکی از اهداف تحقیق حاضر، بررسی اثرات نانوذرات نقره بر روی بیان ژن Bap تشکیل دهنده بیوفيلم در سویه های بالینی اسینتوباکتریومانی بود. نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت های SubMIC از نانوذرات می تواند اثر بازدارندگی بر روی تشکیل بیوفيلم داشته باشد و بیان ژن Bap را در سویه های بیوفيلم مثبت کاهش دهد. به نظر می رسد نانوذرات نقره بر روی ساختمان غشای سلول باکتریایی با مداخله در فرآیندهای انتقال یون ها و هم چنین تنفس سلولی منجر به کاهش تولید بیوفيلم می شود. هم چنین نتایج حاصل از این مطالعه می تواند رویکردی جذاب در

هم چنین به شکل خوراکی یا تماسی در بدن استفاده نمود. با توجه به اهمیت مقاومت آنتی بیوتیکی، مطالعه سایر ژن های ویروالانس مرتبط با بیوفیلم مانند کوروم سنسینگ و ارتباط آن با تولید بیوفیلم پیشنهاد می گردد.

سپاسگزاری

مقاله حاضر استنتاج شده از داده های پایان نامه مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق با شماره ۲۸۳۳۰۵۶۰۹۵۲۰۰۸ می باشد.

References

1. Abdiali A, Hendiani S, Mohammadi, P, Gharavi S. Assessment of biofilm formation and resistance to imipenem and ciprofloxacin among clinical isolates of acinetobacterbaumannii in Tehran. Jundishapour J Microbiol 2014; 7: 8606. doi: 10.5812/jjm.8606.
2. Amro NA, Kotra LP, Wadumesthrige K, Bulychev A, Mobashery SL. High resolution atomic force microscopy studies of the Escherichia coli outer membrane structural basis for permeability. Langmuir 2000; 16: 2789-96. doi: 10.1021/la991013x
3. Pourhajibagher M, Hashemi FB, Pourakbari B, Aziemzadeh M, Bahador A. Antimicrobial resistance of acinetobacter baumannii to imipenem in Iran a systematic review and meta-analysis. Open Microbiol J 2016; 10: 32-42. doi: 10.2174/1874285801610010032.
4. Aliakbarzade K, Farajnia S, Kariminik A. Prevalence of aminoglycoside resistance genes in Acinetobacter baumannii isolates from patients in Tabriz city. Jundishapour J Microbiol 2013; 6: 219-27. doi: 10.5812/jjm.11924
5. Sharma BK, Saha A, Rahaman L, Bhattacharjee S, Tribedi P. Silver Inhibits the biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa. Adv Microbiol 2015; 5: 677-85. doi: 10.4236/aim.2015.510070.
6. Brossard KA, Campagnari AA. The Acinetobacter baumannii biofilm associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. Infect Immun 2012; 80: 228-33. doi: 10.1128/IAI.05913-11.
7. Donelli G, Vuotto C. Biofilm based infections in long term care facilities.

درمان موفق عفونت های ناشی از باکتری اسیتوباکتر بومانی باشد. نتایج Real Time PCR نشان داد که به دنبال تیمار سویه ها با غلظت SubMIC نانوذرات نقره، تمامی سویه ها دارای کاهش بیان معناداری در ژن Bap ($P < 0.05$) نسبت به ژن کنترل بودند.

از آن جایی که نانوذرات نقره به عنوان نانوذرات فلزی اثرات خوبی را روی سویه های مورد آزمایش اسیتوباکتر دارند می توان از این ماده به شکل گسترده در ضد عفونی کردن محیط و پسماندهای بیمارستانی و

- Future Microbiol 2014; 9: 175-88. doi: 10.2217/fmb.13.149.
8. Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. The ecology biology and pathogenesis of Acinetobacter spp. Microbes Environ 2011; 26: 101-12. doi: https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10179.
9. Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M, Morelli G, Galdiero M. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. Molecules 2015; 20: 8856-74. doi: 10.3390/molecules20058856.
10. Humberto HL, Garzatreveno EN, Ixtepanturrent L, Singh DK. Silver nanoparticles are broad spectrum bactericidal and virucidal compounds. J Nanobiotechnol 2011; 9: 1-8. doi: 10.1186/1477-3155-9-30.
11. Hwang ET, Lee JH, Chae YJ, Kim YS, Kim BC, Sang B, et al. Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress specific bioluminescent bacteria. Small 2008; 4: 746-50. doi: 10.1002/sml.200700954.
12. Jalali M, Rasuli I, Jahangiri A, Jalalinadushan M, Alipoor SH. Immunogenicity of amino acid region 7601-8140 in biofilm associated protein of Acinetobacter baumannii. Pathobiol 2014; 4: 15-26.
13. Freeman J, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol 1989; 42: 872-4.
14. Fishbain J, Peleg AY. Treatment of Acinetobacter infections. Clin Infect Dis 2010; 51: 79-84. doi: https://doi.org/10.1086/653120.

15. Gregorio ED, Del Franco M, Martinucci M, Roschetto E, Zarrilli R, Di Nocera PP. Biofilm associated proteins news from *Acinetobacter*. BMC Genom 2015;16: 933. doi: 10.1186/s12864-015-2136-6.
16. Qi L, Li H, Zhang C, Liang B, Li J, Wang L, et al. Relationship between Antibiotic resistance biofilm formation and biofilm specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. Front Microbiol 2016; 10: 483. doi: 10.3389/fmicb.2016.00483.
17. Azizi O, Shahcheraghi F, Salimizand H, Modarresi F, Shakibaie MR, Mansouri S, Ramazanzadeh R, et al. Molecular analysis and expression of bap gene in biofilm forming multi drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Rep Biochem Mol Biol 2016; 5: 68-74.
18. Singh R, Nadhe S, Wadhwani S, Shedbalkar U, Chopade B. A nanoparticles for control of biofilms of *Acinetobacter* species. Mate Basel 2016; 9: 383. doi: 10.3390/ma9050383.
19. Eslami K, Molaabbaszade H, Hamidi M, Bahmanabadi R. Antibiotic resistance pattern in *Acinetobacter* strains isolated from clinical specimens of Tehran arad hospital. Front Microbiol 2013; 19: 1-5.
20. Longo F, Vuotto, Donelli G. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. New Microbiol 2014; 37:119-27.
21. Hendiani S, Abdiali A, Mohammadi P, Kharrazi S. Synthesis of silver nanoparticles and its synergistic effects in combination with imipenem and two biocides against biofilm producing *Acinetobacter baumannii*. Nanomed J 2015; 2: 291-8. doi: 10.7508/nmj.2015.04.007.
22. Hendiani S, Abdiali A, Mohammadi P. Comparison of two methods for quantification of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. Biol J Microorganism 2014; 2: 51-6.

The Inhibitory Effects of Silver Nanoparticles on Bap Gene Expression in Antibiotic-Resistant *Acinetobacter* *baumanni* Isolates using Real-Time PCR

Pirigharaghie T¹, Sadatshandiz A^{2*}

(Received: May 26, 2018

Accepted: September 12, 2018)

Abstract

Introduction: *Acinetobacter baumannii* is one of the most common opportunistic pathogens in hospitals that are resistant to many antibiotics due to biofilm production. Nowadays, silver nanoparticles (AgNPs) have received wide attention in medicine due to their physical and chemical properties. This study aimed to evaluate the anti-biofilm activity of silver nanoparticles on antibiotic-resistant *A. baumannii* strains.

Materials & Methods: In this experimental study, *A. baumannii* was isolated from 100 clinical samples. After identification of *A. baumannii* strains and determination of antibiotic resistant profiles, biofilm-producing isolates were determined using Congo red agar at 37°C after 24 hours. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the strains against AgNPs was determined. After 24 hours of exposure of the strains to

sub-MIC concentration of AgNPs, RNA extraction and cDNA synthesis were performed. Finally, Bap gene expression was measured using real time PCR method.

Finding: Out of 100 clinical isolates, 12 belonged to *A. baumannii*, and all the strains were resistant to antibiotics, except for colistin. Real-time PCR results show that all the strains had a significant down-regulation in Bap gene expression compared to the control gene ($P < 0.05$).

Discussion & Conclusions: According to the anti-biofilm effects of AgNPs, it seems that AgNPs can be used as drug candidates in pharmaceutical industries.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Biofilm, Bap, Silver nanoparticle

1. Dept of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Dept of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* Corresponding author Email: Ata.sadatshandiz@iauctb.ac.ir