اثرات مهاری نانوذرات نقره بر بیان ژن ایجاد کننده بیوفیلم(bap) در سویه های اسینتوباکتربومانی مقاوم به آنتی بیوتیک با استفاده از روش Real Time PCR

توحید پیری قراقیه[۱]، سید عطااله سادات شاندیز[۲*]

۱) گروه زیست شناسی، واحدتهران 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 بیوفیلم 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 ضدبیوفیلمی نانوذرات نقره بر روی ایزوله های مقاوم به آنتی بیوتیک اسینتوباکتر بومانی می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، سویه های اسینتوباکتربومانی از ۱۰۰ نمونه بالینی جداسازی شدند. بعد از شناسایی سویه های اسینتوباکتربومانی و تعیین مقاومت میکروبی آن ها، توانایی تشکیل بیوفیلم 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 بیوفیلم Bap با استفاده از روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته های پژوهش: از میان ۱۰۰ نمونه بالینی، ۱۲ نمونه مربوط به اسینتوباکتربومانی بودند که به تمامی آنتی بیوتیک ها به جز کلیستین مقاوم بودند. نتایج PCR نشان داد که تمامی ۱۲ سویه دارای ژن تشکیل بیوفیلم 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 بیوفیلمی 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: اسینتوباکتربومانی، بیوفیلم، 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.175]

مقدمه

اسینتوباکتربومانی پاتوژن فرصت طلبی است که همواره به عنوان یکی از مهم ترین عوامل بیماری زای عفونت های بیمارستانی شناسایی شده است(۱،۲). یکی از مشکلات عمده در درمـــان و پیشـــگیری از عـــفونـــت هـــای ایجـــاد شـــده توســـط اسینتوباکتربومانی، مقاومت های آنتی بیوتیکی ایجاد شده در آن می باشد. اسینتوباکتربومانی مقاومت چند دارویی ایجاد می کند که این پدیده توسط انواع مقاومت های آنتی بیوتیکی مختلف ثابت شده است از جمله فعال سازی پمپ های افلاکس، تولید آنزیم های بتالاکتاماز، کاهش نفوذپذیری غشای خارجی، سنتز آنزیم هـــایی مثل فســـفریل ترانســـفرازها و استیل ترانسفرازها که باعث مقاومت به آمینو گلیـــکوزیدها می شود. علاوه بر موارد ذکر شده مکانیسم دیگری در مقاومت آنتی بیوتیکی اسینتوباکتربومانی تحت عنوان بیوفیلم وجود دارد(۳). بیوفیـــلم ها اجتماعات پیچیده باکتریایی متصل به سطوح هستند که توسط یک ماتریکس خارج سلولی تولید شده توسط باکتری ها ایجاد می شوند. این ماتریکس از پلی ساکاریدها، DNA و پروتئین ها تشکیل شـــده است(۴). بیوفیلم های باکتریایی مشکلات بسیـــاری را در زمینه پزشکی، صنعتی و محیطی ایجاد می کنند. چسبیدن باکتری ها به سطوح مسئله مهمی در اکولوژی، بیوتکنولوژی، آلودگی زیستی و تیمار فاضلاب است(۵). پروتئین های مختلفی در ایجاد این مقاومت تاثیر گذارند که از این بین می توان به پروتئین های ایجادکننده و تقویت کننده ساختار بیوفیلم اشاره کرد. اولین عضو این گروه از پروتئـــین ها با عنـــوان BAP در باکـــتری اسینتوباکتربومانی شناسایی شده است. این پروتئین در سطح خارجی باکتری ها قرار دارند. شامل هسته مرکزی متشکل از تکرارهای متوالی از توالی های مشابه هستند. به باکتری قابلیـــت تشکیل بیـــوفیلم می دهند به این ترتیب نقش مهمی در عفونت زایی پاتوژن ها دارند(۶). امروزه محققان در حال جستجوی راه حل های جدید برای درمان باکتری های مقاوم به دارو هســـتند. یکی از زمیـــنه هـــای کاربـــردی نانوبیوتکنـــولوژی استـــفاده از نانوذرات در درمان عفونت های میکروبی می باشد(۷). از زمان باستان خواص ضدمیکروبی نقره شناخته شده است ولی اخیراً به دلیل ساخته شدن نقره به صورت نانوذرات، سطح تماس افزایش یافته و خاصیت ضد میکروبی آن تا بیش از ۹۹ درصد افزایش یافته است(۸). نقره در ابعاد بزرگتر فلزی خاصیت واکنش دهی کمی دارد، ولی زمانی که به ابعاد کوچک تر در حد نانومـــتر تبدیل می شود، خاصیت میکروب کشی آن افزایش می یابد، به همین دلیل در پزشکی به بررسی اثرات آن اهمیت داده می شود(۹). نانوذرات نقره به علت داشتن بار سطحی و نسبت سطح به حجم بالای خود، آنزیم ها و DNA میکروارگانیـــسم ها را با تـــعادل الکترون بین گروه های دهنده الکترون مثل تیول، کربوکسیلات، آمید، ایمیدازول، اندول و هیدروکسیل غیـــر فعـــال می سازند. تغییرات ضد میکروبی که از رشد باکتری بیماریزا ممانعت می کنند، یک هدف مطلوب محسوب می شود(۱۰). از آن جا که در زمان تشکیل بیوفیلم باکتری هزینه های درمان بالا رفته و گران بودن درمان های فعلی برای درمان بیوفیلم آن و هم چنین عدم کارایی کافی درمان های موجود، استفاده از نانوذرات نقره برای درمان می تواند راهکار مناسبی تلقی گردد. به دلیل مقاومت های آنتی بیوتیکی اسینتوباکتربومانی، کلاس های کمی از آنتی بیوتیک ها می توانند برای درمان عفونت های ناشی از این باکتری مورد استفاده قرار گیرند. به همین دلیل ایمی پنم ها و کارباپنم ها یکی از مهم ترین آنتی بیوتیک های مورد استفاده می باشند. این آنتی بیوتیک ها آخرین خط درمانی در درمان عفونت های ناشی از باکتری های گرم منفی، از جمله اسینتوباکتر بومانی می باشند. از این رو اصلی ترین مـــقاومت به کارباپنـــم ها را می توان در بـــیان ژن هـــای Bap جستـــجو کـــرد(۱۱). اسینتوباکتربومانی با بیان ژن Bap سبـــب کـــاهش نفوذپذیری و در نتیجه ایجاد مقاومت به کارباپنـــم ها می شود و علاوه بر آن با چسبندگی بالایی که با سطح زنده و غیرزنده ایجاد می کند موجب پایداری بالای عامل بیماریزا می شود(۱۲). هدف از این مطالعه بررسی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.175]

تاثیر نانوذرات نقره بر میزان بیان ژن BAP می باشد که در ایجاد بیوفیلم در سویه های مقاوم به داروی اسینتوباکتربومانی 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 ایزوله های باکتریایی: در این پژوهش طی سال های ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۶، طی مدت پنج ماه، تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی مشکوک به اسینتوباکتر از بیمارستان شهید چمران شهر تهران جمع آوری شد و در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس نمونه های اسینتوباکتر 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) CLSI استفاده شد. دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده در این مطالعه از شرکت MAST تهیه شد که شامل ایمی پنم(µg ۱۰)، جنتامایسین(µg ۱۰)، سیپروفلوکسازین(µg ۵)، سفتازیدین(µg ۳۰)، ایمیکاسین(µg ۳۰)، پیپرسیلین تازوباکتام و کولیسین(µg ۱۰) بود.

تست فنوتیپی تشخیص بیوفیلم: 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 اسینتوباکتربومانی در پلیت حاوی محیط کشت کنگو رد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. باکتری های تولیدکننده بیوفیلم 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 اسینتوباکتربومانی 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 ضدبیوفیلمی نانوذرات نقره: اثرات کمی ضدبیوفیلمی نانوذرات نقره با استفاده از روش میکروتیترپلیت و با غلظت ۵۰ میکرولیتر زیرحد کشندگی نانوذرات استفاده شد. سنجش کمی بیوفیلم 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 اسینتوباکتربومانی 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.175]

RNA، این نسبت جذب برابر با ۲ قبـــول بود. ساخت cDNA از روی RNA استـــخراج شده، پـــس از تعیین مقدار و غلظت RNA حاصل از ســـلول های بـــیوفیلم مثبت اسنیتوباکـــتربومانی تیـــمار شـــده توسط دستـــگاه نانـــودراپ، مطـــابق با کیـــت فرمنـــتاز(Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis Kit) انـــجام گرفت.

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

در این پژوهش برای انجام تـــست RealTime PCR از مسترمیکس حاوی ســـایبر 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 نانـــوذرات نقره بررســـی 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 هـــای ژنی و ابـــزار آنلاین BLAST، صحت پرایمرها انجام شد. در جدول شماره ۱ توالی جفت پرایـــمرهای جـــلوبر و برگشـــتی دو ژن bap و 16s rRNA مشخص شده است.

بر طبق دستورالعمل، مـسترمیکس، پرایمرهـا و cDNA سنتز شده در حجم مناسـبی مخلـوط شـده و توسـط دسـتگاه Bioneerexieycler 96 Real-time PCR واکـــنش انجام گـــردید. حـــجم 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 تقطیـر اسـتریل 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 اسینتوباکتربومانی به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. برای هر نمونه، واکـنش دو مرتبـه انجام گرفته و میانگین مقادیر به دست آمده به عنـوان مقـدار(کمیت) بیان ژن برای آن نمونه در نظر گرفته شد. از فرمـول مرجـع نـسبی بیـان $\Delta\Delta Ct$ 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 قـــرار گـــرفت. 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 اسینتوباکتربومانی 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 اسینتوباکترهای جداسازی شده به تمام آنتی بیوتیک های ایمی پنم، جنتامایسین، سیپروفلوکسازین، سفـــتازیدین، ایمیکاسین، پیپرسیلین،

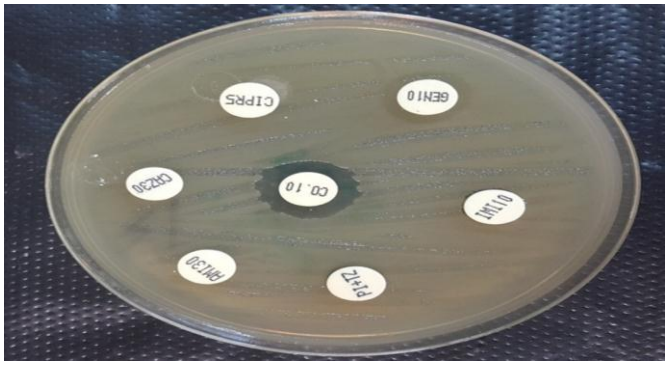
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.175]

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

جدول شماره ۲. نتایج حاصل از تست حساسیت میکروبی

اسینتوباکتربومانی					
علامت اختصاری	عامل ضد میکروبی	غلظت(میکروگرم)	حساس	حساسیت بینابینی	مقاوم
IMI	ایمی پنم	۱۰	≤۱۶	۱۵-۱۴	≥۱۳
GEN	جنتامایسین	۱۰	≤۱۵	۱۴-۱۳	≥۱۲
CIR	سیپروفلوکسازین	۵	≤۲۱	۲۰-۱۶	≥۱۵
CAZ	سفتازیدین	۳۰	≤۱۸	۱۷-۱۵	≥۱۴
AMI	آمیکاسین	۳۰	≤۱۶	۱۵-۱۴	≥۱۴
PTZ	پیپراسیلین-تازوباکتام	-	≤۲۱	۲۰-۱۸	≥۱۷
CO	کولستین	۱۰	-	-	



شکل شماره ۱. تست آنتی بیوگرام اسینتوباکتربومانی. میزان مقاومت و حساسیت سویه های اسینتوباکتربومانی 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 اسینتوباکتربومانی

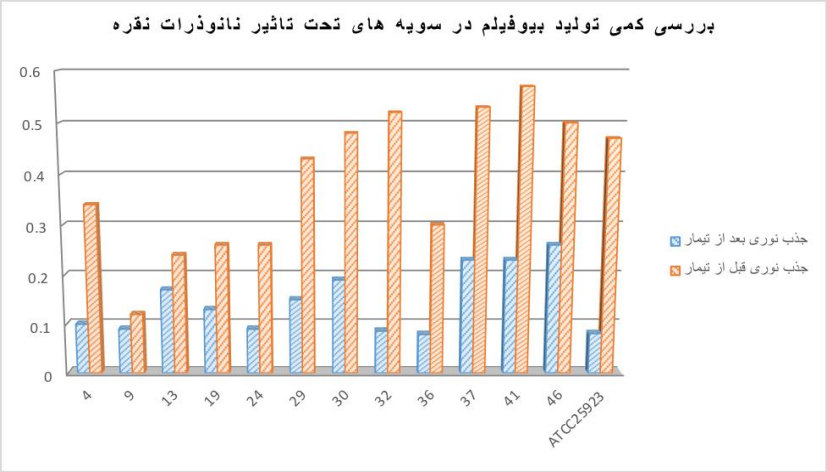
شماره سویه	MIC (µg/ml)
۴	۶/۲۵
۹	۱۲/۵
۱۳	۵۰
۱۹	۱۲/۵
۲۴	۲۵
۲۹	۱۲/۵
۳۰	۶/۲۵
۳۲	۳/۱۲۵
۳۶	۲۵
۳۷	۶/۲۵
۴۱	۶/۲۵
۴۶	۲۵
ATCC ۲۵۹۲۳	۵۰۰

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.175]

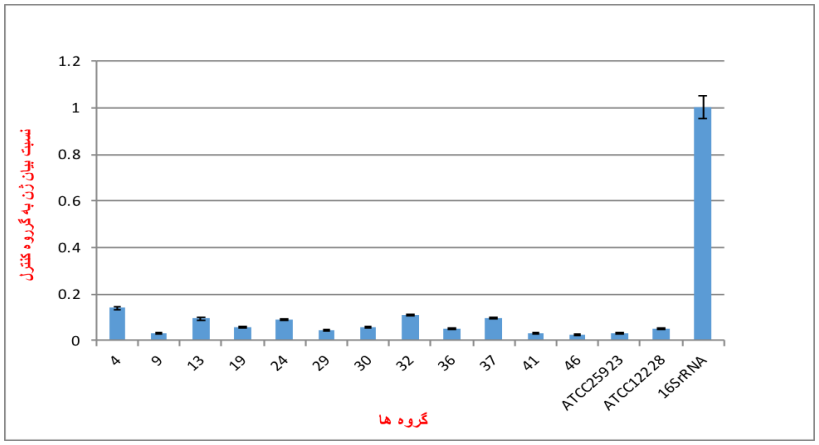
بررسی کمی اثرات ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره: ارزیابی کمی اثرات ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره با کمک روش میکروتیترپلیت انجام گرفت. نتایج این روش نشان داد که توانایی تشکیل بیوفیلم در تمامی سویه ها در غلظت SubMIC نانوذرات نقره از دست رفته است که در نمودار شماره ۱ مشخص شده است.

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



نمودار شماره ۱. بررسی کمی تولید بیوفیلم در سویه های تحت تاثیر نانوذرات نقره

نتایج بررسی بیان ژن bap در سویه های بیوفیلم مثبت در غلظت های subMIC از نانوذرات توسط روش Real Time PCR: نتایج حاصل از نسبت بیان ژن bap نسبت به ژن مرجع در سویه های بیوفیلم مثبت در نمودار شماره ۲ آمده است. نتایج نشان داد که سویه 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($P<0.05$).

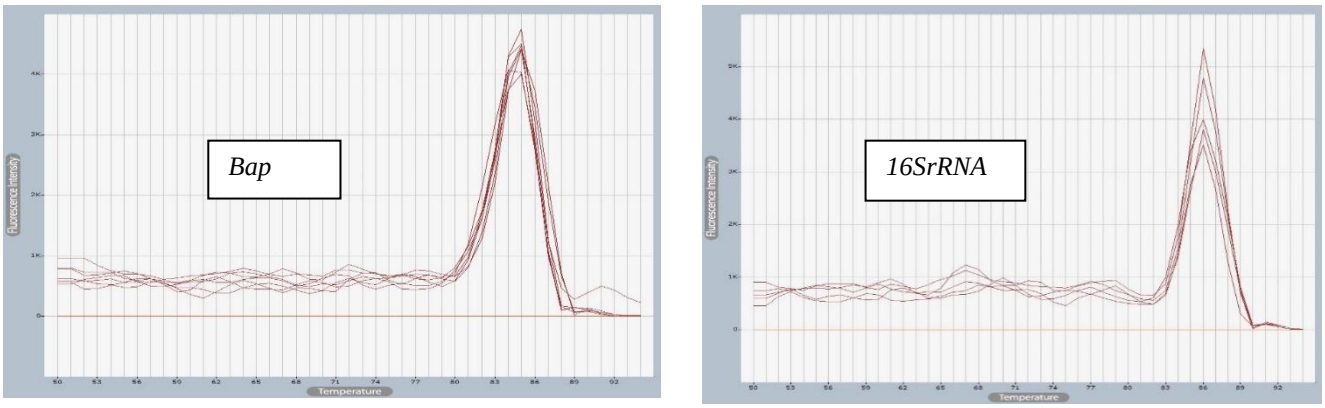


نمودار شماره ۲. میزان بیان ژن bap در سویه های تیمار شده با نانوذرات نقره. همان طور که مشاهده می شود بیان ژن bap در سویه های تیمار شده با نانوذرات نقره در مقایسه با ژن کنترل کاهش معناداری داشته اند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.175]

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 ۸٤/۹

بحث و نتیجه گیری

اسینتوباکتربومانی 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 اسینتوباکتربومانی، مقاومت های آنتی بیوتیکی ایجاد شده در آن می باشد و کارباپنم ها به آخرین خط درمان در عفونت های ناشی از باکتری های گرم منفی، از جمله اسینتوباکتربومانی می باشند. اصلی ترین عامل مقاومت به کارباپنم را می توان تولید بیوفیلم 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 بیوفیلم در سویه های بالینی اسینتوباکتربومانی مقام به آنتی بیوتیک بوده است. پژوهش بر روی توانایی اتصال، تشکیل بیوفیلم و ژن های مداخله گر در تشکیل بیوفیلم در سویه های مختلف اسینتوباکتربومانی می تواند اطلاعات امیدوارکننده ای در مورد درک بهتر روند پیچیده ایجاد بیوفیلم 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 بیوفیلم(Bap) در باکتری های مختلف بوده است. برای مثال، گریگوریوو همکاران در سال ۲۰۱۵ میلادی مطالعه ای در خصوص پروتئین های مربوط به بیوفیلم اسینتوباکتر انجام دادند. آن ها اعلام نمودند که پروتئین بزرگی به نام BAP در تشکیل بیوفیلم و چسبیدن اسینتوباکتربومانی به سلول میزبان نقش دارد. نتایج این گروه نشان داد که به نظر می رسد چندین پروتئین دارای تکرارهای Ig-like در تشکیل بیوفیلم دخیل باشند(۱۵). می توان گفت محققین بسیاری وجود داشته اند که علاقه به بررسی مقاومت باکتری اسینتوباکتربومانی 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 بیوفیلم و مقاومت ویژه بیوفیلم در اسینتوباکتربومانی انجام دادند. در مطالعه آن ها ارتباط بین مقاومت آنتی بیوتیکی، تشکیل بیوفیلم و مقاومت ویژه بیوفیلم در ایزوله های بالینی اسینتوباکتربومانی بررسی گردید(۱۶).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.175]

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

ریچا سینگ و همکاران در سال ۲۰۱۶ میلادی مطالعه ای مبنی بر نانوذرات برای کنترل عفونت ناشی از بیوفیلم گونه های اسینتوباکتر انجام دادند. در گزارش آن ها به اهمیت نقش نانوذرات مختلف به عنوان عوامل ضد بیوفیلمی در اسنیتو باکتر، مواد پوشاننده سطح برای کنترل و درمان بیوفیلم های اسینتوباکتر پرداخته شد و نتیجه مثبت تاثیر نانوذرات بر کاهش تولید بیوفیلم 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 آراد تهران را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج مطالعه این گروه نشان از افزایش مقاومت سویه های اسنیتوباکتر 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 بیوفیلم را در ثبات و بقای باکتری در محیط به خصوص در بیمارستان ها که عاملی برای ایجاد عفونت های بیمارستانی می باشد را نشان دهند. ویدالو همکاران در سال ۱۹۹۶ میلادی در خصوص ساختار بیوفیلم ثابت نمودند که در باکتری اسینتوباکتربومانی سلول های چسبنده ای که با روکش های گوناگونی پوشیده می شوند به شکل حد واسط در شرایط کمبود مواد غذایی تشکیل ساختار بیوفیلم و پایدار می دهد. یافته ها حاکی از افزایش سریع در شمار و تعداد سلول های بیوفیلم و افزایش نسبی در شمار سلول های حاوی مقاومت وجود دارد. این تحقیق ثابت کرد که وجود بیوفیلم 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 بیوفیلم تشکیل شده توسط اسینتوباکتربومانی اثرات نانوذرات نقره به تنهایی و در ترکیب با بیوسایدها و ایمی پنم بر ضد بیوفیلم های اسینتوباکتربومانی 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 بیوفیلم شوند اما اثر آن ها در ترکیب با ایمی پنم بر ضد اشکال بیوفیلم ها و شکل پلانکتونی اسینتوباکتربومانی موثرتر است(۲۱). هندیایی و همکاران در سال ۱۳۹۱ مطالعه ای در خصوص مقایسه فعالیت ضد بیوفیلمی نانوذره نقره و چند ترکیب ضد میکروبی دیگر بر علیه سویه های اسینتوباکتر مولد بیوفیلم 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 بیوفیلم و حذف بیوفیلم های بالغ، کاهش دوز موثر داروها، افزایش کارآیی 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 بیوفیلم در سویه های بالینی اسینتوباکتربومانی بود. نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت های SubMIC از نانوذرات می تواند اثر بازدارندگی بر روی تشکیل بیوفیلم داشته باشد و بیان ژن Bap را در سویه های بیوفیلم 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 بیوفیلم می شود. هم چنین نتایج حاصل از این مطالعه می تواند رویکردی جذاب در

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.175]

درمـان موفـق عفونـت هـای ناشـی از باکتـــری اسـینتوباکتربومانی باشـد. نتـایج Real Time PCR نشـان داد کـه بـه دنبـال تیمـار سـویه هـا بـا غلظـت SubMIC نانوذرات نقره، تمامی سویه ها دارای کاهش بیان معنـاداری در ژن Bap (P<0.05) نسـبت بـه ژن کنترل بودند.

از آن جایی که نانوذرات نقره بـه عنـوان نـانوذرات فلزی اثرات خوبی را روی سـویه هـای مـورد آزمـایش اسینتوباکتر دارند می توان از این ماده به شکل گسترده در ضدعفونی کردن محیط و پسماندهای بیمارستانـی و هم چنین به شکل خوراکی یا تماسی در بـدن اسـتفاده نمـود. با توجه به اهمیت مقاومت آنتی بیوتیکی، مطالعه سایر ژن های ویرولانس مرتبط با بیوفیلم مانند کـوروم سنسینگ و ارتباط آن با تولید بیوفیـــلم پیـــشنهاد می گردد.

سپاسگزاری

مقـــاله حـــاضر استـــنتاج شـــده از داده های پایان نامه مصـــوب دانـــشگاه آزاد اســـلامی واحد تهـــران شـــرق با شـــــماره 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 Immun2012; 80: 228-33. doi: 10.1128/IAI.05913-11.

7.Donelli G, Vuotto C. Biofilm based infections in long term care facilities. 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, Garzatrevino 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/smll.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 Pathol1989; 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.175]

15.Gregorio ED, Del Franco M, Martinucci M, Roscetto E, Zarrilli R, Di Nocera PP. Biofilm associated proteins news from Acinetobacter. BMC Genom2015;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 Microbiol2016; 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.175]

The Inhibitory Effects of Silver Nanoparticles on Bap Gene Expression in Antibiotic-Resistant Acientobacter bumanni Isolates using Real-Time PCR

Pirigharaghie T[1], Sadatshandiz A[2]*

(Received: May 26, 2018 Accepted: September 12, 2018)

Abstract

Introduction: Acinetobacter bomanni 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. bumanni strains.

Materials & Methods: In this experimental study, A. bumanni was isolates from 100 clinical samples. After identification of A. bummani 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. bummani, 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: Acientobacter bummani, 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*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.4.175]