

# Synergistic Effect of Silver Nanoparticles and Streptomycin Antibiotic on the MexX Gene Expression of Pump Efflux System in Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains

Ali Mohammad<sup>1</sup> , Farahnaz Molavi<sup>1\*</sup> , Samaneh Dolatabadi<sup>2</sup> 

1. Dept of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran  
2. Dept of Biology, Neyshbour Branch, Islamic Azad University, Neyshbour, Iran

## Article Info

**Article type:**  
Research article

**Article History:**  
Received: 04 September 2021  
Revised: 17 May 2021  
Accepted: 01 December 2021  
Published Online: 28 May 2022

**\* Correspondence to:**  
Farahnaz Molavi  
Dept of Biology, Mashhad Branch,  
Islamic Azad University, Mashhad,  
Iran.  
Email: Farahmolavi@gmail.com

## ABSTRACT

**Introduction:** *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important infectious agents in humans, which is difficult to control in hospitals due to its resistance to various antibiotics. Efflux pump systems play an important role in the drug resistance of this bacterium to a variety of antibiotics. This study aimed to determine the antimicrobial synergistic effect of silver nanoparticles and the antibiotic streptomycin on the MexX gene expression.

**Material & Methods:** In this cross-sectional descriptive study, 49 samples were collected from 11 medical diagnostic laboratories in Mashhad from 1398 to 1399. After the treatment of multidrug-resistant bacteria with inhibitors, the microdilution method and Real Time-PCR technique were used to determine the effective dilution of silver nanoparticles and probiotics on the expression of the MexX gene of the bacterium.

(Ethic code: IR.IAU.MSHD.REC.1400.018)

**Findings:** All 49 collected samples of *Pseudomonas aeruginosa* were identified. All strains had the MexX gene, and all were resistant to more than two antibiotics. The minimum inhibitory concentration (MIC) results and expression of the MexX gene showed that the MIC in the agar dilution method for silver nanoparticles was up to 500 µg/ml. Evaluation of the synergistic effect of silver nanoparticles with streptomycin antibiotic showed that plates containing streptomycin antibiotic disk with silver nanoparticles with the dilution of 250 µg/ml caused a growth inhibition zone according to the CLSI standard. Silver nanoparticles with streptomycin synergy had a greater effect in inhibiting bacterial growth, and this effect was greater than that of silver nanoparticles ( $P > 0.05$ ).

**Discussion & Conclusion:** Silver and streptomycin have inhibitory and antibacterial activity to reduce the function of the MexXY-OprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* ( $P > 0.05$ ).

**Keywords:** Iran, MexXY-OprM, Multidrug resistance, Nanomaterials, *Pseudomonas*

## How to cite this paper

Mohammad A, Molavi F, Dolatabadi S. Synergistic Effect of Silver Nanoparticles and Streptomycin Antibiotic on the MexX Gene Expression of Pump Efflux System in Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2022;30(2): 41-50.



## بررسی اثر هم‌افزایی نانوذرات نقره و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین بر بیان ژن جزء MexX دستگاه افلاکس پمپ در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به دارو

علی محمد<sup>۱</sup> ID، فرحناز مولوی<sup>۱\*</sup> ID، سمانه دولت‌آبادی<sup>۲</sup> ID

۱ گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران  
 ۲ گروه زیست‌شناسی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

### اطلاعات مقاله / چکیده

#### نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۳

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۰

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۳/۰۷

#### نویسنده مسئول:

فرحناز مولوی

گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد،

دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

Email:

Farahmolavi@gmail.com

**مقدمه:** سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل مهم عفونت‌زا در انسان است که به سبب مقاوم شدن به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، کنترل عفونت ناشی از آن در بیمارستان‌ها دشوار است. سامانه‌های پمپ افلاکس نقش مهمی در مقاومت دارویی این باکتری به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. هدف این مطالعه، تعیین اثر هم‌افزایی ضد میکروبی نانوذرات نقره و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین روی بیان ژن MexX است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مقطعی - توصیفی، ۴۹ نمونه از ۱۱ آزمایشگاه تشخیص طبی مشهد طی سال‌های ۱۳۹۹-۱۳۹۸ جمع‌آوری شد. پس از تیماردهی باکتری‌های دارای مقاومت چنددارویی با مواد مهارکننده، از روش میکرودایلوشن و فن Real time-PCR به ترتیب برای تعیین رقت اثربخش نانوذرات نقره و پروبیوتیک بر بیان ژن MexX باکتری مولد آن استفاده گردید.

**یافته‌ها:** همه ۴۹ نمونه جمع‌آوری شده سودوموناس آئروژینوزا تأیید هویت شدند. همه سویه‌ها ژن MexX داشتند و همه آن‌ها به بیش از دو آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. نتایج MIC و بیان ژن MexX نشان داد که کمینه غلظت بازدارندگی در روش رقت در آگار برای نانوذرات نقره تا رقت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. ارزیابی اثر هم‌افزایی نانوذرات نقره به همراه آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین نشان داد که پلیت‌های حاوی دیسک آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین به همراه نانوذرات نقره با رقت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سبب ایجاد هاله عدم رشد مطابق با استاندارد CLSI می‌شود. نانوذرات نقره با هم‌افزایی استرپتومایسین تأثیر بیشتری در مهار رشد باکتری داشت و میزان این تأثیر نسبت به اثر نانوذرات نقره بیشتر است ( $P > 0.05$ ).

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که نانوذرات نقره و استرپتومایسین فعالیت مهارتی و آنتی‌باکتریال برای کاهش عملکرد پمپ افلاکس MexXY-OprM در باکتری سودوموناس آئروژینوزا دارند ( $P > 0.05$ ).

**واژه‌های کلیدی:** MexXY-OprM، سودوموناس، مقاومت چنددارویی، نانومواد، ایران

← **استناد:** محمد، علی؛ مولوی، فرحناز؛ دولت‌آبادی، سمانه. بررسی اثر هم‌افزایی نانوذرات نقره و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین بر بیان ژن جزء MexX

دستگاه افلاکس پمپ در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به دارو. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، تیر ۱۴۰۱؛ ۳۰(۲): ۵۰-۴۱.



مدت‌هاست که برای کاهش عفونت‌های میکروبی پوست و زخم‌های پوستی استفاده می‌شود. فعالیت ضد میکروبی نانوذرات در برابر باکتری‌ها با دو سازوکار اتفاق می‌افتد: ۱. نانوذرات با اتصال به غشای باکتری در نفوذپذیری غشا و فرایند تنفس اختلال ایجاد می‌کنند؛ ۲. نانوذرات می‌توانند به درون باکتری نفوذ کنند و با ترکیبات دارای گوگرد و فسفر واکنش دهند (۱۲).

استرپتومایسین یک آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزیدی است که مانند سایر داروهای این گروه، با عبور فعال از غشای باکتری مانع یبوست پروتئین توسط ریبوزوم‌ها می‌شود. این آنتی‌بیوتیک‌ها وسیع‌الطیف هستند و به‌ویژه بر باکتری‌های گرم منفی مؤثرند؛ اما امروزه، به سبب عوارض جانبی کاربردشان محدود شده است و برای درمان عفونت‌های شدید استفاده می‌شود که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های دیگر مقاوم باشند. در این تحقیق، اثر هم‌افزایی نانوذرات نقره با استرپتومایسین بررسی شد تا اثر هم‌افزایی آن‌ها بر بیان ژن MexX تعیین گردد که یکی از اجزای مهم عوامل مقاومت در سودوموناس آئروژینوزا است.

### مواد و روش‌ها

شناسایی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا: این مطالعه به صورت توصیفی-مقطعی، در ارتباط با ۴۹ سویه سودوموناس آئروژینوزای جمع‌آوری شده از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهر مشهد طی سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۹ صورت گرفت. به منظور تأیید شناسایی سویه‌های بررسی شده از رنگ‌آمیزی گرم، بررسی ظاهر کلنی از نظر موکوئیدی یا صاف بودن، از آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی شامل کشت روی محیط‌های افتراقی سیمون سترات آگار، TSI (Triple Sugar Iron)، EMB (Eosin Methylene Blue)، SIM (Sulfide Indole Motility) و آزمون‌های اکسیداز و کاتالاز استفاده گردید (همه محیط‌های کشت از شرکت پارس پیوند خریداری شد) (۱۳). سویه‌ها در محیط

سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی بیماری‌زا و فرصت‌طلب است که موفقیت کامل برای مهار عفونت آن به دست نیامده است (۱). این باکتری یکی از عوامل مهم ایجاد عفونت‌های بیمارستانی است و به‌ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه، مشکلات فراوانی را به بار می‌آورد و همچنین عامل عفونت مزمن تنفسی و علت اصلی مرگ‌ومیر بیماران دارای سیستمیک فیبروزیس (CF) است (۲).

مقاومت این باکتری به گروه‌های آنتی‌بیوتیکی مختلف مانند آمینوگلوکوزیدها، کینولون‌ها و بتالاکتام‌ها، درمان آنتی‌بیوتیکی را با شکست مواجه می‌کند (۳). مطالعات نشان می‌دهد که مصرف آنتی‌بیوتیک‌های رایج قادر به کنترل عفونت این باکتری نیستند (۴-۵). سودوموناس آئروژینوزا با سازوکارهای متفاوتی مقاومت به ترکیبات ضدباکتریایی را نشان می‌دهد و سامانه‌های پمپ افلاکس یکی از مهم‌ترین سازوکارهای کسب مقاومت ذاتی این باکتری به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها است (۶، ۷). سودوموناس آئروژینوزا توانایی بیان ۱۲ نوع مختلف پمپ تراوشی مقاومت چنددارویی با نام‌های Mex-Type Multidrug Resistance Efflux Pump را دارد که پنج پمپ MexXY- oprM، MexAB- oprM، MexCD- oprT، MexEF- oprN و MexJK- oprM فراوان‌تر از بقیه هستند (۸) و پمپ MexXY- oprM یکی از پمپ‌های مهمی است که مسئول خارج کردن آنتی‌بیوتیک‌های گروه آمینوگلوکوزیدها در باکتری سودوموناس آئروژینوزا است.

در حال حاضر، آنتی‌بیوتیک‌ها پرکاربردترین داروی ضد میکروبی برای کنترل عفونت‌های باکتریایی هستند (۹)؛ اما گسترش روزافزون مقاومت ذاتی باکتری‌ها به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها مشکل جدی ایجاد کرده است (۱۰)؛ به این سبب، در تحقیقات اخیر مطالعات به سوی شناسایی مواد غیر آنتی‌بیوتیکی مانند نانومواد رفته است تا بتوان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها را کاهش داد (۱۱، ۱۰). نانوذرات

با استفاده از کیت استخراج DNA (Qiagen, Hilden, Germany) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. پرایمرها با استفاده از نرم‌افزارهای Gene Runner (vol.6.5.50) طراحی گردیدند و توسط روش BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) تأیید شدند (جدول شماره ۱). واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲ میکرولیتر (ایران، سیناکلون) PCR master mix 5X دارای ۵ U/μl Taq DNA polymerase، ۲/۵ mM MgCl<sub>2</sub>، ۲/۵ mM dNTPs، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها، ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۶ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) با برنامه دمایی ۱ سیکل دناتوراسیون ابتدایی شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه، واسرشته شدن ۹۴ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر ۵۸ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله طولیل شدن ۷۲ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه و یک مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه صورت گرفت. پس از انجام PCR، محصولات روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، باندهای به دست آمده عکس برداری گردید. در این واکنش از آب به عنوان کنترل منفی و از باکتری دارای ژن MexX به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۶).

تهیه سوسپانسیون نانوذرات نقره: پودر نانوذرات نقره (برند ARMINANO) از شرکت مهندسی پایدار ابتکار آرمینا خریداری گردید و سری رقت نانوذرات نقره با روش رقت سازی سریال با رقت‌های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ تهیه شد. بر اساس روش استاندارد کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه

کشت تجاری LB Broth دارای ۲۰ درصد گلیسرول، در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. سوئه استاندارد این تحقیق *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 بود که به صورت لیوفلیزه خریداری شد (۱۴). گفتنی است که پژوهش حاضر مطابق با دستورالعمل کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، با کد اخلاق IR.IAU.MSHD.REC.1400.018 انجام شده است.

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی: حساسیت سویه‌های باکتری بررسی شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از روش Kirby-Bauer مطابق با استانداردهای CLSI بررسی گردید (۱۵). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی به فاصله ۳ میلی‌متر از لبه پلیت و ۵ میلی‌متر نسبت به یکدیگر قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری گردید و میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها با روش CLSI 2018 به دست آمد (۱۵). دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استفاده شده در این تحقیق از شرکت پادتن طب تهیه شد و شامل جنتامایسین (۱۰ μg)، کلیندامایسین (۱۰ μg)، ایمی‌پنم (۱۰ μg)، تتراسایکلین (۳۰ μg)، سفنازیدیم (۳۰ μg)، کلرامفنیکل (۳۰ μg)، سفازولین (۳۰ μg)، اریترومایسین (۱۵ μg)، استریتومایسین (۱۰ μg) و سولفامتو کسازول (۱۰ μg) بود. در این مرحله، سویه‌هایی که به بیش از یک آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند، به عنوان سویه‌های دارای مقاومت چنددارویی (مقاومت چنددارویی حالتی است که در آن باکتری به بیش از یک ترکیب مقاومت نشان می‌دهد) شناسایی و از آن‌ها برای ادامه کار استفاده شد.

استخراج DNA و شناسایی ژن MexX پمپ افلاکس توسط فن PCR. برای شناسایی ژن MexX پمپ افلاکس در سویه‌های دارای مقاومت چنددارویی، استخراج DNA

جدول شماره ۱. پرایمرهای استفاده شده در Real-Time PCR و PCR

| ژن       | توالی نوکلئوتیدی          | Tm (درجه سانتی گراد) | اندازه محصول (bp) |
|----------|---------------------------|----------------------|-------------------|
| MexX     | CTCTACCCCATCTACGTC +F     | ۵۵/۷۰                | ۳۰۰               |
|          | GTCGTCACGTCGACACCC +R     | ۵۵/۳۲                |                   |
| 16S rRNA | F: CCAACCCCTTTTCCTTACTTGC | ۵۵/۳                 | ۱۱۹               |
|          | R: CATCAACTTCACCTTTCACGC  | ۵۵/۳                 |                   |

جدول شماره ۲. مشخصات ترموسایکلر در Real-Time PCR

| No.        | Step                 | Temperature(0C) | Time     |
|------------|----------------------|-----------------|----------|
| ۱          | Initial denaturation | ۹۵              | ۶۰ ثانیه |
| ۲          | Denaturation         | ۹۵              | ۳۰ ثانیه |
| ۳          | Annealing            | ۵۹              | ۴۰ ثانیه |
| ۴          | Extention            | ۷۲              | ۱ دقیقه  |
| ۵          | Final extention      | ۷۲              | ۷ دقیقه  |
| Cycle(2-4) |                      | ۳۰              |          |

یک میکرولیتر RNasin® Ribonuclease Inhibitor و دو میکرولیتر AMV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer، در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به طول ۶۰ دقیقه انجام شد و در نهایت، ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی گراد (برای غیرفعال کردن آنزیم RT) در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت.

سنجش بیان ژن توسط فن *Real-Time PCR*: واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت Genet کره جنوبی، با ترکیب ۱۰ میکرولیتر Prime Qmaster mix (2x) همراه syber green، ۵ میکرولیتر از Depc water، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر از Rox dye و ۲ میکرولیتر از cDNA انجام شد. تکثیر، مطابق جدول شماره ۲ در ۳۰ چرخه انجام گردید (۱۸). از ژن خانگی 16s rRNA به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. تحلیل داده‌ها در نمونه‌های تیمار شده و کنترل با کمک معادله داده‌ها و رسم نمودارهای نرم افزار LightCycler Relative Quantification صورت گرفت. در نهایت، داده‌های مربوط به تغییر بیان ژن MexX با روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  با فرض کارایی ۱۰۰ درصد و با استفاده از آزمون آماری تی مستقل در سه گروه تحلیل گردید.

### یافته‌ها

تشخیص سویه‌ها: ۱۰۰ درصد سویه‌ها با روش آزمون‌های تشخیصی و تأییدی میکروبیولوژی و بیوشیمیایی به عنوان باکتری سودوموناس آئروژینوزا تأیید شدند.

نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی: قطر هاله‌های

بالینی (CLSI)، تعیین اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره با روش رقت در برات صورت گرفت تا MIC (کمینه غلظت مهارکنندگی) و MBC (کمینه غلظت کشندگی) به دست آید.

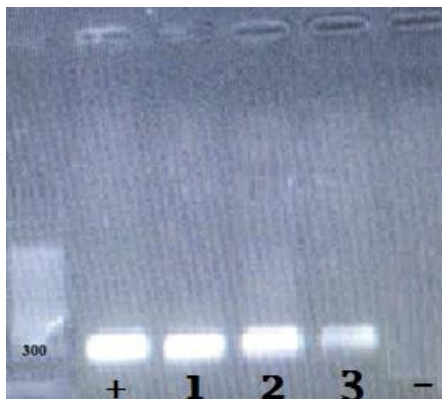
اثر هم‌افزایی نانوذرات نقره با استرپتومایسین، با آغشته کردن دیسک آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم) با بیشترین غلظت نانوذره انجام شد که اثر مهارکنندگی نداشت.

استخراج RNA: پس از تیمار کردن سویه‌ها با نانوذرات نقره (رقت پس از MIC) و هم‌افزایی نانوذرات نقره و استرپتومایسین، استخراج RNA با استفاده از کیت Total RNA Extraction mini Kit (یکتا تجهیز آزما، ایران) انجام گردید. پس از استخراج RNA، برای اطمینان از درستی استخراج، RNA به دست آمده توسط دستگاه نانودراپ با روش جذب نوری ۲۳۰/۲۶۰ و ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر ارزیابی شد. اگر نسبت به دست آمده بین ۱/۸ تا ۲ باشد، مولکول کیفیت لازم برای ادامه کار را دارد. RNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید (۱۷).

ساخت *cdNA*: سنتز *cdNA* با استفاده از کیت *cdNA Synthesis Kit* (یکتا تجهیز آزما، تهران) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. در این روش پس از انکوبه کردن RNA استخراج شده به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد، فرایند نسخه‌برداری معکوس صورت گرفت. این فرایند با ۲ میکرولیتر Random Primer، ۰/۸ میکرولیتر از آنزیم AMV Reverse Transcriptase، ۲ میکرولیتر از 10mM Dntp،

جدول شماره ۳. نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها

| دیسک آنتی‌بیوتیک                 | حساس (درصد) | نیمه‌حساس (درصد) | مقاوم (درصد) |
|----------------------------------|-------------|------------------|--------------|
| آموکسی‌سیلین - کلاونیک اسید (۳۰) | (۰)۰        | (۰)۰             | (۱۰۰)۴۹      |
| جنتامایسین (GM10)                | (۰)۰        | (۰)۰             | (۱۰۰)۴۹      |
| کلیندامایسین (CC2)               | (۰)۰        | (۰)۰             | (۱۰۰)۴۹      |
| ایمی‌پنم (IMp10)                 | ۱۳ (۲۶/۵۳)  | ۹ (۱۸/۳۶)        | ۱۷ (۳۴/۶۹)   |
| تتراسایکلین (TE30)               | (۰)۰        | (۰)۰             | (۱۰۰)۴۹      |
| سفتازیدیم (CAZ30)                | (۰)۰        | (۰)۰             | (۱۰۰)۴۹      |
| کلرامفنیکل (CH30)                | ۳۱ (۶۳/۲۶)  | ۷ (۱۴/۲۸)        | ۱۱ (۲۲/۴۴)   |
| سفازولین (CZ30)                  | (۰)۰        | (۰)۰             | (۱۰۰)۴۹      |
| اریترومایسین (E15)               | (۰)۰        | (۰)۰             | (۱۰۰)۴۹      |
| سولفامتو کسازول (SXI)            | (۰)۰        | (۰)۰             | (۱۰۰)۴۹      |
| استرپتومایسین                    | (۰)۰        | (۰)۰             | (۱۰۰)۴۹      |



شکل شماره ۱. نتایج الکتروفورز حاصل تکثیر ژن MexX (از چپ به راست: مارکر، نمونه‌های مثبت حاوی ژن MexX، کنترل مثبت، کنترل منفی). طول قطعه مدنظر ۳۰۰ جفت باز است.

بیان ژن در سه گروه سلولی تیمار شده با نانوذرات نقره، تیمار شده با اثر هم‌افزایی نانوذرات نقره و استرپتومایسین و تیمار نشده با استفاده از آنالیز منحنی ذوب (Melting curve analysis) و منحنی تکثیر با سه بار تکرار ارزیابی گردید. در منحنی تکثیر دستگاه Real time PCR، نمونه‌های باکتری پیش و پس از تیمار با نانوذرات نقره و نانوذرات نقره-استرپتومایسین و ژن کنترل داخلی بررسی شده با رنگ‌های مختلف نشان داده شده‌اند. همان‌طور که در شکل شماره ۲ و ۳ مشاهده می‌شود، ژن‌هایی که بیان بیشتری داشتند، دارای Ct کمتر بودند و در منحنی، زودتر وارد فاز Exponential شده‌اند و نمونه‌های باکتری پس از تیمار با نانوذرات نقره و نانوذرات نقره-استرپتومایسین بیان کمتر ژن

ایجاد شده در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مدنظر با کولیس اندازه‌گیری گردید و میزان حساسیت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها با توجه به استاندارد CLSL تعیین شد و نتایج به صورت حساس (S)، نیمه‌حساس (IM) و مقاوم (R) ارائه گردید (جدول شماره ۳). در این بررسی، همه سویه‌ها مقاومت به بیش از دو آنتی‌بیوتیک داشتند؛ بنابراین، همه سویه‌ها برای ادامه کار استفاده شدند.

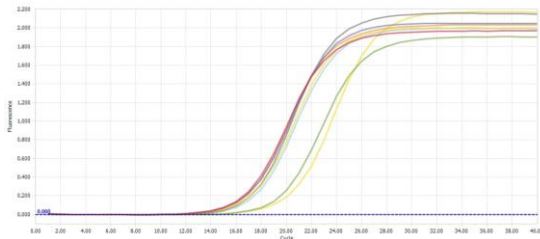
نتایج تکثیر ژن با روش PCR، واکنش PCR روی سویه‌های دارای مقاومت چنددارویی سودوموناس آئروژینوزای جمع‌آوری شده اجرا گردید. تکثیر ژن پمپ افلاکس MexX در سویه‌های باکتری، وجود باند ۳۰۰ bp در ژل الکتروفورز را نشان داد. سویه‌های دارنده ژن مدنظر به عنوان کنترل مثبت (شکل شماره ۱) در نظر گرفته شدند. نتایج ارزیابی مولکولی سویه‌ها نشان داد که همه نمونه‌های با مقاومت چنددارویی، ژن MexX داشتند.

نتایج آزمون MIC: نتایج بررسی MIC یا کمینه غلظت مهار رشد سویه‌های باکتری نشان داد که بهترین غلظت مهارکنندگی برای نانوذرات نقره ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است.

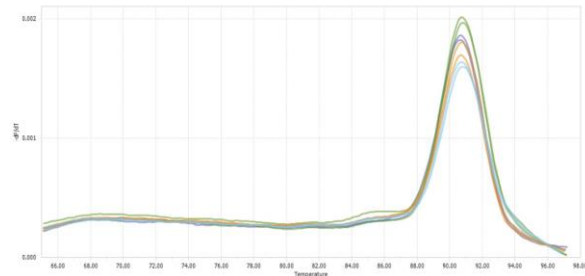
ارزیابی بیان ژن MexX پس از تیمار با نانوذرات نقره و هم‌افزایی استرپتومایسین و نانوذرات نقره: به این منظور،



گروه وجود داشت. کمترین میزان بیان ژن در گروهی دیده شد که با نانوذرات و آنتی‌بیوتیک تیمار شده بودند. گروه تیمار شده با نانوذرات به تنهایی کاهش معناداری در بیان ژن MexX داشت؛ اما نسبت به تیمار هم‌افزایی نانوذرات نقره و استرپتومایسین تأثیر کمتری را نشان می‌دهد (شکل شماره ۴).



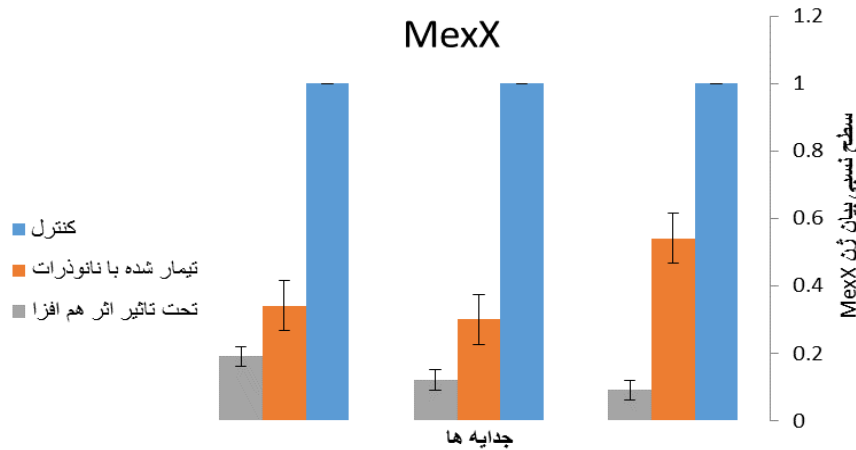
شکل شماره ۳. نتایج منحنی تکثیر محصول در Real time PCR بر حسب سیکل



شکل شماره ۲. آنالیز منحنی ذوب (Melting curve) برای اطمینان از اختصاصی بودن قطعه‌های تکثیر شده ژن که منحنی ژن سنجد شده در همه نمونه‌ها با هم منطبق و به صورت یک قله است.

و Ct بیشتری داشتند.

بر اساس نتایج به دست آمده از سنجش بیان ژن (Pvalue)، اختلاف آماری معنادار در بیان ژن در میان ۳



شکل شماره ۴. نمودار مقایسه بیان ژن MexX در نمونه‌های کنترل و نمونه‌های تیمار شده با نانوذرات نقره و هم‌افزایی نانوذرات نقره و استرپتومایسین در سه تکرار. تفاوت معناداری در همه گروه‌های تیمار در سطح  $P > 0.05$  مشاهده شد. از ژن رفرنس ۱۶S rRNA برای نرمال‌سازی نتایج استفاده گردید.

هنوز دوز مصرف شده آنتی‌بیوتیک‌ها برای از بین بردن عفونت‌های باکتریایی بسیار زیاد است (۲۲). درباره باکتری سودوموناس آئروژینوزا، نتیجه تحقیقات نشان می‌دهد که مقاومت‌های چندارویی در این باکتری گسترش فراوانی داشته است و در بیشتر موارد، درمان آنتی‌بیوتیکی را با شکست مواجه می‌کند (۲۳) و مطالعه حاضر نیز مقاومت چندارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در همه سویه‌های آزمایش شده را تأیید می‌کند.

همه سویه‌های بررسی شده در این پژوهش که از آزمایشگاه‌های سطح شهر مشهد جمع‌آوری شده بودند، به بیش از دو آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند و مقاومت

## بحث و نتیجه‌گیری

سودوموناس آئروژینوزا سومین عامل مهم باکتریایی مسبب عفونت‌های انسانی پس از استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی است (۵). این باکتری فرصت طلب گرم منفی به سبب ایجاد عفونت‌های شدید، مرگ‌ومیر گسترده‌ای را در بیماران دارای ضعف دستگاه ایمنی و بیماران سیستمیک فیبروزیس (CF) به وجود می‌آورد (۱۹، ۲۰). سودوموناس آئروژینوزا قابلیت بسیار بالایی برای بقا در طبیعت دارد و در بیشتر محیط‌های دارای رطوبت حتی آب مقطر نیز زندگی می‌کند (۲۱). با وجود پیشرفت‌هایی که در زمینه تهیه آنتی‌بیوتیک‌های ضدباکتریایی به دست آمده است،

چندارویی داشتند. در سال‌های اخیر، گسترش ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به چند دارو (MDR) در سراسر جهان افزایش داشته است (۲۴). مقاومت این باکتری اغلب نسبت به گروه‌های آنتی‌بیوتیکی مختلف مانند آمینوگلوکوزیدها، کینولون‌ها و بتالاکتام‌ها است (۲۵). درصد مقاومت چندارویی در مطالعه حاضر حدود چهار برابر میزان گزارش شده در مطالعه مشابه در سال ۲۰۰۱ است (۲۶). مهم‌ترین علت افزایش مقاومت در باکتری‌ها استفاده بیش از اندازه از آنتی‌بیوتیک‌هاست (۲۴)؛ به همین علت در سال‌های اخیر، مطالعات بسیاری درباره شناسایی مواد ضدباکتریایی غیرآنتی‌بیوتیکی انجام شده است تا بتوان با استفاده از آن‌ها مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها را کاهش داد. نانوذرات یکی از گزینه‌های مطرح در این مطالعات است که خاصیت ضد میکروبی آن پیش‌تر به اثبات رسیده است. مطالعات گذشته نشان داده است که نانوذرات فلزی مانند اکسید نقره به علت داشتن توان ضد میکروبی می‌تواند به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها بررسی شوند (۲۹، ۲۸، ۲۷). نتایج بررسی حاضر، توانایی ضد میکروبی نانوذرات نقره را تأیید می‌کند و این نتیجه همسو با نتایجی است که نشان می‌دهد نانوذرات نقره یکی از مؤثرترین ترکیبات برای کنترل رشد باکتری‌ها است (۳۰، ۲۹، ۲۸). درباره تأثیر نانوذرات بر بیان ژن‌های پمپ افلاکس سودوموناس آئروژینوزا مطالعات متعددی وجود دارد که اثر نانوذرات نقره بر بیان ژن‌های پمپ افلاکس را تأیید می‌کند. نانوذرات دیگر مانند روی و اکسید روی نیز می‌توانند مانع رشد سودوموناس آئروژینوزا باشند (۳۳، ۳۲، ۳۱). نانوذرات آهن نیز با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌توانند نقش مهارکنندگی بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا داشته باشند (۳۴).

مطالعه پیش‌رو اثر هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و نانوذرات نقره را اثبات می‌کند. همسو با آن، مطالعات فراوانی وجود دارد که آثار هم‌افزایی نانوذرات و آنتی‌بیوتیک‌ها روی باکتری‌های مختلف را اثبات می‌نماید. باکتری‌های مختلف، چه گرم مثبت و چه گرم منفی، تحت

تأثیر این آثار هم‌افزا قرار می‌گیرند، البته این اثر روی باکتری‌های گرم منفی بیشتر است (۳۷، ۳۶، ۳۵). مطالعات گذشته اثر هم‌افزایی ضدباکتریایی ترکیب نانوذرة نقره و آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، اریترومایسین، کانامایسین و کلرامفنیکل را تأیید می‌کند (۳۸). نانوذرات اکسید روی (ZnO) یکی دیگر از نانوذراتی است که اثر هم‌افزایی آن با آنتی‌بیوتیک علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی گزارش شده است (۴۰، ۳۹). در بیشتر مطالعات، آثار ضدباکتریایی نانوذرات فلزی در باکتری‌های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت بوده است (۳۱).

درباره تقابل نانوذرات با پمپ‌های افلاکس تحقیقاتی در گذشته انجام شده است. در سودوموناس آئروژینوزا سامانه‌های پمپ افلاکس غشایی نقش مهمی در کسب مقاومت ذاتی این باکتری به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها دارند (۴۱). سودوموناس آئروژینوزا توانایی بیان دوازده نوع پمپ تراوشی مسبب مقاومت چندارویی با عنوان Mex-Type Multidrug Resistance Efflux Pump را دارد که پمپ MexXY-OprM یکی از مهم‌ترین آن‌هاست (۴۲). در مطالعه حاضر، نانوذرات نقره به‌تهدایی یا با همراهی استرپتومایسین توانستند که بیان ژن MexX را کاهش دهند. این نتیجه برخلاف مطالعه شریف و امینی در سال ۲۰۱۹ است که نشان دادند هم‌افزایی نانوذرات اکسید آهن و پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیديوم نسبت به ایزوله‌های کنترل تغییر بیان ژن MexA را ایجاد نمی‌کنند (۴۳).

با توجه به اینکه ژن‌های افلاکس MexXY-OprM به‌صورت کروموزومی در نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا وجود دارند و سوبه‌های دارای مقاومت چندارویی حامل اجزای ژنی این سامانه یعنی MexX هستند، شاید این ژن بتواند به‌عنوان وسیله تشخیصی در شناسایی مولکولی سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به دارو استفاده شود؛ همچنین با توجه به معناداری اثر نانوذرات نقره و استرپتومایسین بر بیان ژن MexX ( $P > 0.05$ ) می‌توان ترکیب نانوذرات نقره با استرپتومایسین را برای کنترل عفونت ناشی از این باکتری آزمود تا شاید با این هم‌افزایی،



سرگزی که در همه مراحل اجرای پایان نامه مشاور طرح بوده‌اند و سرکار خانم فائزه غلامی بهار و آقای علی قرایی و همه کارشناسان محترم آزمایشگاه گروه زیست‌شناسی به سبب همکاری در همه مراحل سپاس‌گزاری می‌گردد.

کد اخلاق: IR.IAU.MSHD.REC.1400.018

## References

- Grosjean M, Guenard S, Giraud C, Muller C, Plesiat P and Juarez P. Targeted genome reduction of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 Led to the development of hypovirulent and hypersusceptible rDNA hosts. *Front Bioeng Biotechnol* 2021; 9: 640-50. doi: 10.3389/fbioe.2021.640450 .
- Grainha T, Jorge P, Alves D, Lopes SP, Pereira MO. Unraveling *pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* communication in coinfection scenarios: insights through network analysis. *Front Cell Infect Microbiolog* 2020; 10: 550-9. doi: 10.3390/microorganisms9020412.
- Behzadi P, Barath Z, Gajdacs M. It's not easy being green: A narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics* 2021; 10: 42-53. doi: 10.3390/antibiotics10010042.
- Broniewski JM, Chisnall MA, Høyland-Kroghsbo NM, Buckling A, Westra ER. The effect of Quorum sensing inhibitors on the evolution of CRISPR-based phage immunity in *Pseudomonas aeruginosa*. *ISME J* 2021; 10:1-9. doi: 10.1038/s41396-021-00946-6.
- Rossi E, La Rosa R, Bartell JA, Marvig RL, Haagensen JA, Sommer LM, et al. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. *Nat Rev Microbiol* 2021; 19: 331-42. 10. doi: 10.3390/antibiotics11030419.
- Li R, Peng K, Xiao X, Liu Y, Peng D, Wang Z. Emergence of a multidrug resistance efflux pump with carbapenem resistance gene blaVIM-2 in a *Pseudomonas putida* megaplasmid of migratory bird origin. *J Antimicrob Chemother.* 2021; 76:1455-1458. doi: 10.1093/jac/dkab044.
- Fabre L, Ntrel AT, Yazidi A, Leus IV, Weeks JW, Bhattacharyya S, et al. A "Drug Sweeping" State of the TriABC Triclosan Efflux Pump from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure* 2021; 29:261-274.e6. doi: 10.1016/j.str.2020.09.001.
- Zahedani SS, Tahmasebi H, Jahantigh M. Coexistence of virulence factors and efflux pump genes in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: Analysis of Biofilm-Forming strains from Iran. *Int J Microbiol* 2021; 5557361. doi: 10.1155/2021/5557361
- Seupt A, Schniederjans M, Tomasch J, Häussler S. Expression of the MexXY aminoglycoside efflux pump and presence of an aminoglycoside-modifying enzyme in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates are highly correlated.

میزان دوز مصرفی آنتی‌بیوتیک‌ها را بتوان کاهش داد.

## تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه شماره ۱۶۱۵۹۵ برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، از دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد بود. بدین‌وسیله از سرکار خانم بهاره

- Antimicrob agent chemother 2020; 12: e01166-20. doi: 10.1128/AAC.01166-20.
- Albadiri V, Molavi F, Tehranipoor M. The effect of silver nanoparticles on blaTEM gene expression in beta-lactamase-resistant samples in *Escherichia coli*. *B J Microorganism.* 2021; 39: 87-100. doi: 10.22108/BJM.2021.125907.1353.
- Wang Y, Jiang Y, Deng Y, Yi C, Wang Y, Ding M, et al. Probiotic Supplements: Hope or Hype? *Front Microbiol* 2020; 11:160. doi: 10.3389/fmicb.2020.00160.
- Quang HT, Van QN, and Anh-Tuan L. "Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology , applications and perspectives". *Adv Nat Sci: Nanosci Nanotechnol* 2013; 4: 1-20. doi: 10.1080/21691401.2019.1620757.
- Gaby W, Hadley C. Practical laboratory test for the identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *J bacterial* 1957; 74: 356-61. doi:10.1016/21691401.2019.1620757.
- 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: 68-74. doi: 10.21010/ajid.v11i2.9.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th ed. CLSI supplement M100S. 2018. CLSI, PA. 38-40.
- Tang Y, Li B, Dai J, Dai J, Wang X, Si J, et al. Genotyping of *pseudomonas aeruginosa* type III secretion system using magnetic enrichment multiplex polymerase chain reaction and chemiluminescence. *J Biomed Nanotechnol* 2016; 12: 762-9. doi: 10.1166/jbn.2016.2222.
- 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: 754-66. doi: 10.1186/s13104-015-1726-3.
- Cavallo JD, Fabre R, Leblanc F, NicolasChanoine 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: 133-6. doi: 10.1093/jac/46.1.133.
- Rossi E, La Rosa R, Bartell JA, Marvig RL, Haagensen JA, Sommer LM, et al. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients

- with cystic fibrosis. *Nat Rev Microb* 2021; 19: 331-42. doi: 10.1038/s41579-020-00477-5.
20. Moyne O, Castelli F, Bicout DJ, Boccard J, Camara B, Cournoyer B, et al. Metabotypes of *Pseudomonas aeruginosa* Correlate with Antibiotic Resistance, Virulence and Clinical Outcome in Cystic Fibrosis Chronic Infections. *Metabolites* 2021; 11: 63-72.
  21. 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: 235-8. doi: 10.3390/s41579-020-00477-5.
  22. Rossi E, La Rosa R, Bartell JA, Marvig RL, Haagenen JA, Sommer LM, et al. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. *Nat Rev Microb* 2021; 19: 331-42. doi: 10.1038/s41579-020-00477-5.
  23. Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Roy Soc Med* 2002; 95(Suppl 41): 22-6. doi: 10.4103/joacp.JOACP\_349\_15.
  24. Tahmasebi H, Dehbashi S, Arabestani MR. Antibiotic resistance alters through iron-regulating Sigma factors during the interaction of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep* 2021; 11: 1-3. doi: 10.1038/s41598-021-98017-5.
  25. Pogue JM, Kaye KS, Veve MP, Patel TS, Gerlach AT, Davis SL, et al. Ceftolozane/tazobactam vs polymyxin or aminoglycoside-based regimens for the treatment of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2020; 71: 304-10. doi:10.1093.
  26. 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: 258-62. doi: 10.29252/ijmr-040202.
  27. Huang Y, Bai L, Yang Y, Yin Z, Guo B. Biodegradable gelatin/silver nanoparticle composite cryogel with excellent antibacterial and antibiofilm activity and hemostasis for *Pseudomonas aeruginosa*-infected burn wound healing. *J Colloid Interface S* 2021; doi: 10.1016/j.jcis.2021.10.131.
  28. 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 Biosys Eng* 2021; 44: 443-52. doi: 10.1007/s00449-020-02454-x.
  29. 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. *Braz J Microbiol* 2021; 52: 267-78. doi: 10.1007/s42770-020-00406-x.
  30. Saeki EK, Yamada AY, de Araujo LA, Anversa L, de Oliveira Garcia D, Barros De Souza RL, et al. Subinhibitory concentrations of biogenic silver nanoparticles affect motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Cell Infect Microbiol* 2021; 11: 253-69. doi: 10.3389/fcimb.2021.656984.
  31. Minh Dat N, Linh VN, Huy LA, Huong NT, Tu TH, Phuong NT, et al. Fabrication and antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* of silver nanoparticle decorated reduced graphene oxide nanocomposites. *Mater Technol* 2019; 34: 369-75. doi: 10.3390/pr9040589.
  32. Al Dahmash ND, Al-Ansari MM, Al-Otibi FO, Singh AR. Frankincense, an aromatic medicinal exudate of *Boswellia carterii* used to mediate silver nanoparticle synthesis: Evaluation of bacterial molecular inhibition and its pathway. *J Drug Deli Sci Technol* 2021; 61:102337. doi: 10.1016/j.jddst.2021.102337.
  33. Feizi S, Cooksley CM, Bouras GS, Prestidge CA, Coenye T, Psaltis AJ, et al. Colloidal silver combating pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* and MRSA in chronic rhinosinusitis. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2021; 202:111675. doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111675.
  34. Haney, Carl. Effects on Iron nanoparticles on *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms. 2011. University of Dayton, Master's thesis. OhioLINK Electronic Theses and Dissertations Center, [http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc\\_num=dayton1324058048](http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc_num=dayton1324058048).
  35. Bee SL, Bustami Y, Ul-Hamid A, Lim K, Abdul Hamid ZA. Synthesis of silver nanoparticle-decorated hydroxyapatite nanocomposite with combined bioactivity and antibacterial properties. *J Mater Sci Mater Med* 2021; 32: 1-2. doi: 10.1007/s10856-021-06590-y.
  36. Saravanakumar K, Sriram B, Sathiyaseelan A, Mariadoss AV, Hu X, Han KS, et al. Synthesis, characterization, and cytotoxicity of starch-encapsulated biogenic silver nanoparticle and its improved anti-bacterial activity. *Int J Biol Macromol* 2021; 182:1409-18. doi: 10.3390/ma15072388.
  37. 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: 67-82. doi: 20.1001.1.22285458.1399.11.41.6.0.
  38. Fayaz K, Balaji M, Girilal, et al. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2010;6: 103-9. doi: 10.2217/nnm.15.128.
  39. Banoe S, Seif Ze, Nazari, et al. *J Biomed Mater Res Part B: Applied Biomaterials* 2010; 93: 557-61. doi: 10.1002/jbm.b.31615.
  40. Kon K, Rai M. Interactions Between Plant-produced Nanoparticles and Antibiotics as a Way of Coping with Bacterial Resistance. *Green Biosynthesis of Nanoparticles: Mechanisms and Applications*. 2013:180.
  41. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American J med* 2006;119: S3-10. doi: 10.1016/j.amjmed.2006.03.011.
  42. Doi Y, Arakawa Y. S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 2007; 45:88-94. doi: 10.1086/518605.
  43. Sharif R, Amini K. Effect of Iron Oxide nanoparticles and probiotic *Bifidobacterium bifidum* on *MexA* Gene Expression in Drug Resistant Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Med*. 2019; 43: 118-123(persian).