

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

Ali Mohammad¹ , Farahnaz Molavi^{1*} , Samaneh Dolatabadi² 

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

A B S T R A C T

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.



© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

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

علی محمد^۱, فرحناز مولوی^{۱*}, سمانه دولت‌آبادی^۱

^۱ گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

^۲ گروه زیست‌شناسی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

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 آثروزینوزا یکی از عوامل مهم عفونت‌زا در انسان است که به‌سبب مقاوم شدن به انواع آنتیبیوتیک‌ها،

کنترل عفونت ناشی از آن در بیمارستان‌ها دشوار است. سامانه‌های پمپ افلاکس نقص مهمی در مقاومت دارویی این باکتری به انواع آنتیبیوتیک‌ها دارند. هدف این مطالعه، تعیین اثر همافرازی ضدمیکروبی 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 ۱۳۹۸- ۱۳۹۹ جمع‌آوری شد. پس از تیماردهی باکتری‌های دارای مقاومت چندارویی با مواد مهارکننده، از روش میکرودایلوشن و فن Real time-PCR به ترتیب برای تعیین رقت اثربخش نانوذرات نقره و پروپیوتیک بر بیان ژن MexX باکتری مولد آن استفاده گردید.

یافته‌ها: همه ۴۹ نمونه جمع‌آوری شده سودوموناس آثروزینوزا 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 همافرازی 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 هالة عدم رشد مطابق با استاندارد CLSI می‌شود. نانوذرات نقره با همافرازی

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 مهاری و آنتیباکتریال برای کاهش

عملکرد پمپ افلاکس MexXY-OprM در باکتری سودوموناس آثروزینوزا دارند ($P<0.05$).

واژه‌های کلیدی: MexXY-OprM, سودوموناس، مقاومت چندارویی، نانوماد، ایران

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

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



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 سیستیک فیروزیس (CF) است (۲).

مقاومت این باکتری به گروه‌های آنتی‌بیوتیکی مختلف مانند آمینوگلوكوزیدها، 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). سودوموناس آئروژینوزا توانایی بیان ۱۲ نوع مختلف پمپ تراوشی مقاومت چنددارویی با نام‌های Mex-Type Multidrug Resistance Efflux Pump، MexXY- oprM، MexAB-oprM، MexJK-oprM، MexEF-oprN، MexCD-oprT فراوان‌تر از بقیه هستند (۸) و پمپ MexXY- oprM یکی از پمپ‌های مهمی است که مسئول خارج کردن آنتی‌بیوتیک‌های گروه آمینوگلوكوزیدها در باکتری سودوموناس آئروژینوزا است.

در حال حاضر، آنتی‌بیوتیک‌ها پرکاربردترین داروی ضدمیکروبی 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 به‌سوی شناسایی مواد غیرآنتی‌بیوتیکی مانند نانومواد رفته است تا بتوان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها را کاهش داد (۱۱، ۱۰). نانوذرات

مدت‌هاست که برای کاهش عفونت‌های میکروبی پوست و زخم‌های پوستی استفاده می‌شود. فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات در برابر باکتری‌ها با دو سازوکار اتفاق می‌افتد: ۱. نانوذرات با اتصال به غشاء 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 غشاء باکتری مانع بیوسنتر پروتئین توسط ریبوزوم‌ها می‌شود. این آنتی‌بیوتیک‌ها وسیع‌الطیف هستند و به‌ویژه بر باکتری‌های گرم منفی مؤثرند؛ اما امروزه، به‌سبب عوارض جانبی کاربردشان محدود شده است و برای درمان عفونت‌های شدیدی 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 سویه سودوموناس آئروژینوزای جمع‌آوری شده از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهر مشهد طی سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۹ صورت گرفت. به‌منظور تأیید شناسایی سویه‌های بررسی شده از رنگ‌آمیزی گرم، بررسی ظاهر کلی از نظر موکوئیدی یا صاف بودن، از آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی شامل کشت روی محیط‌های افترافقی سیمون سیترات آگار، TSI (Triple Sugar)، SIM، EMB (Eosin Methylene Blue)، Iron، Sulfide Indole Motility و آزمون‌های اکسیداز و کاتالاز استفاده گردید (همه محیط‌های کشت از شرکت پارس پیوند خریداری شد) (۱۳). سویه‌ها در محیط

با استفاده از کیت استخراج DNA (Qiagen, Hilden, Germany) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. پرایمرها با استفاده از نرم افزارهای Gene Runner BLAST vol.6.5.50 طراحی گردیدند و توسط روش (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) تأیید شدند (جدول شماره ۱). واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل PCR master mix ۵X ۱۲ میکرولیتر (ایران، سیناکلون) ۲/۵Mm دارای Taq DNA polymerase ۵ U/µl ۳MgCl₂ ۲/۵ mM از dNTPs، ۱ میکرولیتر از هریک از پرایمرها، ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۶ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل با استفاده از گردایانت ترموسایکلر (پندرورف، آلمان) با برنامه دمایی ۱ سیکل دناتوراسیون ابتدایی شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه، و اسرشته شدن ۹۴ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر ۵۸ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله طویل 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، از باندهای بدست 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 رقت های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ تهیه شد. بر اساس روش استاندارد کمیتۀ ملی استانداردهای آزمایشگاه

کشت تجاری LB Broth دارای ۲۰ درصد گلیسرول، در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. سویۀ ATCC27853 Pseudomonas aeruginosa بود که به صورت لیوفلیزه خریداری شد (۱۴). گفتنی است که پژوهش حاضر مطابق با دستورالعمل کمیتۀ اخلاق پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، با کد اخلاق IR.IAU.MSHD.REC.1400.018 انجام شده است. آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی: حساسیت سویه های باکتری بررسی شده نسبت به آنتی بیوتیک ها با استفاده از روش Kirby-Bauer مطابق با استانداردهای CLSI بررسی گردید (۱۵). دیسک های آنتی بیوتیکی به فاصله ۳ میلی متر از لب پلیت و ۵ میلی متر نسبت به یکدیگر قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، قطر هاله عدم رشد اندازه گیری گردید و میزان حساسیت آنتی بیوتیکی سویه ها با روش 2018 CLSI به دست آمد (۱۵). دیسک های آنتی بیوتیک استفاده شده در این تحقیق از شرکت پادتن طب تهیه شد و شامل جنتامایسین (۱۰ µg)، کلیندامایسین (۱۰ µg)، ایمی پن (۱۰ µg)، تراسایکلین (۱۰ µg)، سفتازایدیم (۳۰ µg)، کلرامفینیکل (۳۰ µg)، سفارزولین (۳۰ µg)، اریترومامایسین (۱۵ µg)، استرپتومایسین (۱۰ µg) و سولفامتوکسازول (۱۰ µg) بود. در این مرحله، سویه هایی که به بیش از یک آنتی بیوتیک مقاوم بودند، به عنوان سویه های دارای مقاومت چنددارویی (مقاومت چنددارویی حالتی است که در آن باکتری به بیش از یک ترکیب مقاومت نشان می دهد) شناسایی و از آن ها برای ادامه کار استفاده شد.

استخراج DNA و شناسایی ژن MexX پمپ افلاکس تو سط فن PCR برای شناسایی ژن MexX پمپ افلاکس در سویه های دارای مقاومت چنددارویی، استخراج DNA

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

ژن	توالی نوکلئوتیدی	(درجه سانتی گراد) Tm	اندازه محصول (bp)
MexX	CTCTACCCCCATCTACGTC 'F GTCGTACGTCGACACCC 'R	۵۵/۷۰	۳۰۰
		۵۵/۳۲	
16S rRNA	F:CCAACCCTTTCTACTTGC R:CATCAACTCACCTCACGC	۵۵/۳	۱۱۹
		۵۵/۳	

جدول شماره ۲. مشخصات ترموسایکلر در Real-Time PCR

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

اثر هم افزایی نانوذرات نقره و

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

سنجهش بیان ژن توسط فن Real-Time PCR: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت Prime Genet کره جنوبی، با ترکیب ۱۰ میکرولیتر Depc water ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر از syber green Qmaster mix (2x) و ۲ میکرولیتر از Rox dye 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 تیمارشده و کنترل با کمک معادله داده‌ها و رسم نمودارهای نرمافزار LightCycler Quantification Relative Quantification صورت گرفت. درنهایت، داده‌های مربوط به تغییر بیان ژن MexX با روش 2-ΔΔCT 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 ضدبacterیایی نانوذرات نقره با روش رقت در براث صورت گرفت MIC (کمینه غلظت مهارکنندگی) و MBC (کمینه غلظت کشنندگی) به دست آید.

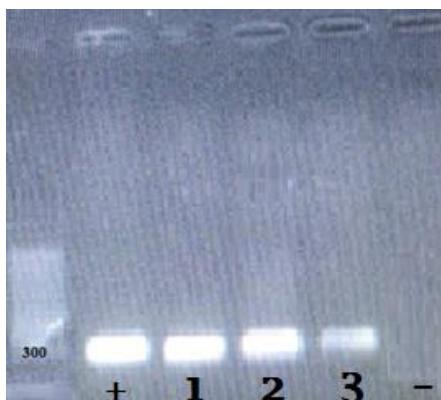
اثر هم افزایی نانوذرات نقره با استرپتومایسین، با آغشته کردن دیسک آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم) با بیشترین غلظت نانوذره انجام شد که اثر مهارکنندگی نداشت.

استخراج RNA پس از تیمار کردن سویه‌ها با نانوذرات نقره (رقت پس از MIC) و هم افزایی نانوذرات نقره و استرپتومایسین، استخراج RNA با استفاده از کیت Total RNA Extraction mini Kit (یکتا تجهیز آزماء، ایران) انجام گردید. پس از استخراج RNA، برای اطمینان از درستی استخراج، RNA به دست آمده توسط دستگاه نانودرایپ با روش جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۳۰/۲۶۰ 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 xDNA سنتز cDNA با استفاده از کیت cDNA Synthesis Kit (یکتا تجهیز آزماء، 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 AMV Random Primer ۰/۸ میکرولیتر از آنزیم Reverse Transcriptase ۱۰mM Dntp ۲ میکرولیتر از

جدول شماره ۳. نتایج آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی سویه ها

دیسک آنتی بیوتیک	میزان حساسیت	حساس (درصد)	نیمه حساس (درصد)	مقاوم (درصد)
آموکسی سیلین - کلاونیک اسید (۳۰)	(۱۰۰) ۴۹	(۰)	(۰)	(۱۰۰) ۴۹
(GM10)	(۱۰۰) ۴۹	(۰)	(۰)	(۱۰۰) ۴۹
کلیندامایسین (CC2)	(۱۰۰) ۴۹	(۰)	(۰)	(۳۴/۶۹) ۱۷
ایمی بنم (IMp10)	(۱۸/۳۶) ۹	(۲۶/۵۳) ۱۳	(۰)	(۳۴/۶۹) ۱۷
(TE30)	(۱۰۰) ۴۹	(۰)	(۰)	(۱۰۰) ۴۹
سفنازیدیم (CAZ30)	(۱۰۰) ۴۹	(۰)	(۰)	(۲۲/۴۴) ۱۱
کلرامفیکل (CH30)	(۱۴/۲۸) ۷	(۶۳/۲۶) ۳۱	(۰)	(۱۰۰) ۴۹
(CZ30)	(۱۰۰) ۴۹	(۰)	(۰)	(۱۰۰) ۴۹
اریترومایسین (E15)	(۱۰۰) ۴۹	(۰)	(۰)	(۱۰۰) ۴۹
سولفامتو کسازول (SXI)	(۱۰۰) ۴۹	(۰)	(۰)	(۱۰۰) ۴۹
استرپتو مایسین	(۱۰۰) ۴۹	(۰)	(۰)	



شکل شماره ۱. نتایج الکتروفورز حاصل تکثیر ژن MexX (از چپ به راست: مارکر، نمونه های مثبت حاوی ژن MexX، 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 هم افزایی نانوذرات نقره و استرپتو مایسین و Melting curve تیمار شده با استفاده از آنالیز منحنی ذوب (analysis) و منحنی تکثیر با سه بار تکرار ارزیابی گردید. در منحنی تکثیر دستگاه Real time PCR، نمونه های باکتری پیش و پس از تیمار با نانوذرات نقره و نانوذرات نقره- استرپتو مایسین و ژن کنترل داخلي بررسی شده با رنگ های مختلف نشان داده شده اند. همان طور که در شکل شماره ۲ و ۳ مشاهده می شود، ژن هایی که بیان بیشتری داشتند، دارای Ct کمتر بودند و در منحنی، زودتر وارد فاز Exponential شده اند و نمونه های باکتری پس از تیمار با نانوذرات نقره و نانوذرات نقره- استرپتو مایسین بیان کمتر ژن

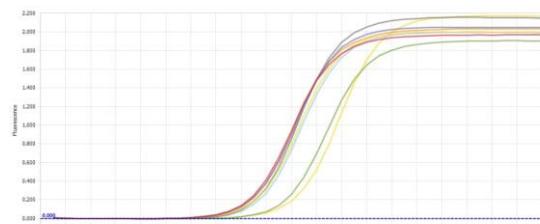
ایجاد شده در اطراف دیسک های آنتی بیوتیکی سویه های مدنظر با کولیس اندازه گیری گردید و میزان حساسیت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک ها با توجه به استاندارد CLSI تعیین شد و نتایج به صورت حساس (S)، نیمه حساس (IM) و مقاوم (R) ارائه گردید (جدول شماره ۳). در این بررسی، همه سویه ها مقاومت به بیش از دو آنتی بیوتیک داشتند؛ بنابراین، همه سویه ها برای ادامه کار استفاده شدند.

نتایج تکثیر ژن با روش PCR واکنش PCR روی سویه های دارای مقاومت چند دارویی سودوموناس آئروژینوزای جمع آوری شده اجرا گردید. تکثیر ژن pmp افلاکس MexX در سویه های باکتری، وجود باند ۳۰۰ bp در ژل الکتروفورز را نشان داد. سویه های دارنده ژن مدنظر به عنوان کنترل مثبت (شکل شماره ۱) در نظر گرفته شدند. نتایج ارزیابی مولکولی سویه ها نشان داد که همه نمونه های با مقاومت چند دارویی، ژن MexX داشتند.

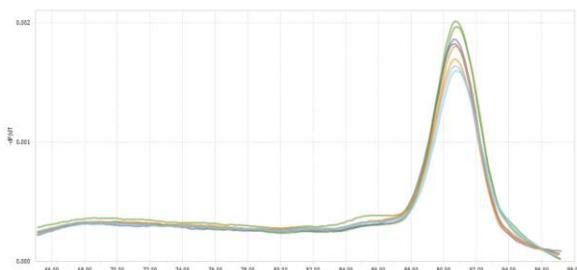
نتایج آزمون MIC نتایج بررسی MIC یا کمینه غلظت مهار رشد سویه های باکتری نشان داد که بهترین غلظت مهار کنندگی برای نانوذرات نقره ۵۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر است.

ارزیابی بیان ژن MexX پس از تیمار با نانوذرات نقره و هم افزایی استرپتو مایسین و نانوذرات نقره؛ به این منظور،

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



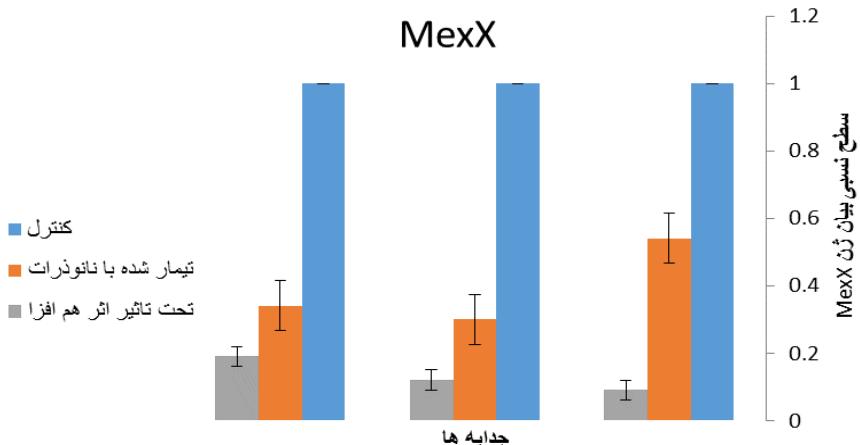
شکل شماره ۳. نتایج منحنی تکثیر محصول در Real time PCR بر حسب سیکل



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

و Ct بیشتری داشتند.

بر اساس نتایج بدست‌آمده 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 تیمارشده با نانوذرات نقره و هم افزایی نانوذرات نقره و استرپتومایسین در سه تکرار. تفاوت معناداری در همه گروه‌های تیمار در سطح $P < 0.05$ مشاهده شد. از ژن رفنس 16sRNA 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 چنددارویی در این باکتری گسترش فراوانی داشته است و در بیشتر موارد، درمان آنتیبیوتیکی را با شکست مواجه می‌کند (۲۳) و مطالعه حاضر نیز مقاومت چنددارویی 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 فرست طلب گرم منفی به‌سبب ایجاد عفونت‌های شدید، مرگ‌ومیر گسترده‌ای را در بیماران دارای ضعف دستگاه ایمنی و بیماران سیستیک فیروزیس (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 بدست‌آمده است،

چنددارویی داشتند. در سال‌های اخیر، گسترش ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به چند دارو (MDR) در سراسر جهان افزایش داشته است (۲۴). مقاومت این باکتری غالب نسبت به گروه‌های آنتی‌بیوتیکی مختلف مانند آمینوگلوكوزیدها، کینولون‌ها و بتالاکتام‌ها است (۲۵). درصد مقاومت چنددارویی 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 ضدمیکروبی آن پیش‌تر به اثبات رسیده است. مطالعات گذشته نشان داده است که نانوذرات فلزی مانند اکسید نقره به علت داشتن توان ضدمیکروبی می‌توانند به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها بررسی شوند (۲۹، ۲۸، ۲۷). نتایج بررسی حاضر، توانایی ضدمیکروبی 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 (۲۸، ۲۹، ۳۰).

درباره تأثیر نانوذرات بر بیان ژن‌های پمپ افلاکس سودوموناس آئروژینوزا مطالعات متعددی وجود دارد که اثر نانوذرات نقره بر بیان ژن‌های پمپ افلاکس سودوموناس آئروژینوزا باشند (۳۱، ۳۲، ۳۳). نانوذرات آهن نیز با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌توانند نقش مهارکننده‌گی 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 (۳۵، ۳۶، ۳۷). 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 (۳۹، ۴۰). 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 Mex-Type تراویشی مسبب مقاومت چنددارویی با عنوان Multidrug Resistance Efflux Pump (MDRE) یکی از مهم‌ترین آن‌هاست (۴۲). در مطالعه حاضر، نانوذرات نقره به تنهایی 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 بیفیدیو باکتریوم بیفیدیوم نسبت به ایزوله‌های کنترل تغییر بیان ژن MexA را ایجاد نمی‌کنند (۴۳).

با توجه به اینکه ژن‌های افلاکس MexXY-OprM به صورت کروموزومی در نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا وجود دارند و سویه‌های دارای مقاومت چنددارویی حامل اجزای ژنی این سامانه یعنی MexX هستند، شاید این ژن بتواند به عنوان 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 پایاننامه مشاور طرح بوده‌اند و سرکار خانم فائزه غلامی بهار و آفای علی قرابی و همه کارشناسان محترم آزمایشگاه گروه زیست‌شناسی بهسبب همکاری در همه مراحل سپاس‌گزاری می‌گردد.

کد اخلاق: IR.IAU.MSHD.REC.1400.018

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 سلوی و مولکولی، از دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد بود. بدین‌وسیله از سرکار خانم بهاره

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 Microbiol* 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, Ntreh 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. *Antimicrob agent chemother* 2020; 12: e01166-20. doi: 10.1128/AAC.01166-20.
- Albadiri V, Molavi F, Tehrani poor 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 CJJob. 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, 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.
 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 Infec 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=dayto n1324058048.
 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. Saravanan Kumar K, Sriram B, Sathyaseelan 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. Banoei 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).