

Chitosan Nanoparticles: As an Anti-Biofilm Agent against *Acinetobacter* Strains *baumannii* Representing the Multidrug Resistance Phenotype

Ghazal Ghajari^{1*} , Negin Rajaei² , Arijit Chakraborty³ 

¹ Dept of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

² Young Researchers and Elite Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

³ National Sports University, Ministry of Youth Affairs and Sports, Government of India, Imphal

Article Info

Article type:
Research article

Article History:

Received: 22 August 2022

Revised: 12 November 2022

Accepted: 26 December 2022

Published Online: 22 May 2023

* Correspondence to:

Dept of Cell and Molecular
Biology, Faculty of Biological
Sciences, Kharazmi
University, Tehran, Iran.

Email:

ghajari.ghazal74@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) is a non-fermentative gram-negative coccobacillus that shows high resistance to antimicrobial compounds. Biofilm formation is one of the essential features of many *Acinetobacter* species that leads to high antibiotic resistance. This study aimed to evaluate the ability of biofilm formation and determine the antibiofilm activity of chitosan nanoparticles in clinical isolates of *A. baumannii*.

Material & Methods: This descriptive cross-sectional study was conducted in 2021 and investigated 100 isolates collected from different hospitals. Microscopic, biochemical, and molecular tests were performed to identify the bacteria. The antibiotic resistance pattern of the isolates was evaluated by the disk diffusion method against 10 antibiotics, and the ability to produce biofilm was evaluated by microtiter plate method. Subsequently, 16SrRNA and *CsuA* genes were identified by multiplex-PCR molecular methods. After the preparation of chitosan nanoparticles and determination of MIC concentration, antibiofilm activity was measured by plate microtiter, and Real-Time PCR was used to examine the expression of the *CsuA* gene involved in biofilm.

Findings: In this study, out of 100 isolates examined, 29 isolates were confirmed as *A. baumannii*. Among 29 isolates, ceftazidime had the highest drug resistance (75.86%). The *CsuA* gene was detected in 51.72% of the isolates. Moreover, using a microtiter plate and Real-Time PCR, the level of antibiotic activity of chitosan nanoparticles was determined at a significant level of $P < 0.01$.

Discussion & Conclusion: Considering the anti-biofilm effects found in the present study, it seems that chitosan nanoparticles can be used as a pharmaceutical candidate in the pharmaceutical industry.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Biofilm, Chitosan nanoparticles

➤ How to cite this paper

Ghajari GH, Rajaei N, Chakraborty A. Chitosan Nanoparticles: As an Anti-biofilm Agent against *Acinetobacter* Strains *baumannii* Represents the Multidrug Resistance Phenotype. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2023;31(2): 1-14.

نانوذرات کیتوسان: به عنوان عامل آنتی بیوفیلم علیه سویه های اسپیتوباکتر

بومانی نشان دهنده فنوتیپ مقاومت چند دارویی MDR

غزل فجری^{۱*}، نگین رجایی^۲، آرجیت چاکرابورتی^۳

^۱ گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

^۲ باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

^۳ دانشگاه ملی ورزش، وزارت امور جوانان و ورزش، دولت هند، ایمفال

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۳۱

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۸/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۰۵

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۳/۰۱

نویسنده مسئول:

غزل فجری

گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی،

دانشکده علوم زیستی، دانشگاه

خوارزمی، تهران، ایران.

Email:

ghajari.ghazal74@gmail.com

مقدمه: اسپیتوباکتر بومانی، کوکوباسیل گرم منفی غیر تخمیری است که مقاومت بالایی به ترکیبات ضد میکروبی نشان می دهد. تشکیل بیوفیلم یکی از ویژگی های مهم بسیاری از گونه های اسپیتوباکتر است که منجر به مقاومت بالا به آنتی بیوتیک ها می شود. مطالعه حاضر با هدف بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم و تعیین فعالیت آنتی بیوفیلم نانوذرات کیتوسان در جدایه های بالینی اسپیتوباکتر بومانی انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه توصیفی- مقطعی در سال ۱۳۹۹، تعداد ۱۰۰ ایزوله از بیمارستان های مختلف جمع آوری و آزمایشات میکروسکوپی، بیوشیمیایی و مولکولی به منظور شناسایی باکتری انجام شد. بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله ها با روش انتشار دیسک در مقابل ۱۰ آنتی بیوتیک و همچنین توانایی تولید بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت بررسی شد. سپس با روش های مولکولی Multiplex-PCR، ژن های CsuA و SrRNA16 شناسایی شدند. پس از تهیه نانوذرات کیتوسان و تعیین غلظت MIC، فعالیت آنتی بیوفیلم توسط روش میکروتیتر پلیت سنجیده شده و میزان بیان ژن CsuA دخیل در بیوفیلم با روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: در این مطالعه از بین ۱۰۰ ایزوله بررسی شده ۲۹ ایزوله به عنوان اسپیتوباکتر بومانی تأیید شدند. از بین ۲۹ ایزوله بیشترین مقاومت دارویی متعلق به سفتازیدیم (۷۵/۸۶٪) بود. ژن CsuA در ۵۱/۷۲٪ ایزوله ها ردیابی شد. همچنین با استفاده از روش میکروتیتر پلیت و Real Time PCR میزان فعالیت آنتی بیوفیلمی نانوذرات کیتوسان با سطح معنی داری $P < 0.01$ مشخص شد.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به اثرات ضد بیوفیلمی مطالعه حاضر، به نظر می رسد نانوذره کیتوسان می تواند به عنوان یک کاندید دارویی در صنایع داروسازی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: اسپیتوباکتر بومانی، بیوفیلم، نانوذرات کیتوسان

استناد: فجری، غزل؛ رجایی، نگین؛ چاکرابورتی، آرجیت. نانوذرات کیتوسان: به عنوان عامل آنتی بیوفیلم علیه سویه های اسپیتوباکتر بومانی نشان

دهنده فنوتیپ مقاومت چند دارویی MDR. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، خرداد ۱۴۰۲؛ ۳۱(۲): ۱-۱۴.

مختلفی از جمله تجهیزات پزشکی و ابزار، مبلمان بیمارستان و حتی روپوش و دستکش ارائه‌دهندگان خدمات بهداشتی را آلوده می‌کند (۶). تشکیل بیوفیلیم *A. baumannii* در چنین سطوح غیر زنده توسط *Csu pili* انجام می‌شود. این مجموعه از ۴ زیرواحد تشکیل شده است که ساختار کریستالی *CsuA-CsuC / B* به عنوان چارپون پیش‌ساز این مجموعه می‌باشد و از اهمیت بالایی برخوردار است. لذا ایجاد اختلال در یکی از این اجزاء باعث اختلال در تشکیل کمپلکس *CsuA-CsuC/B* شده، که متعاقباً از تشکیل بیوفیلیم جلوگیری می‌کند (۶، ۷).

CsuA یک پروتئین در سطح خارجی *A. baumannii* می‌باشد که شامل هسته‌ی مرکزی در ارتباط با انواع پروتئین‌های دخیل در مقاومت دارویی است. این پروتئین به باکتری قابلیت تشکیل بیوفیلیم و اتصال به سطوح را می‌دهد و به این ترتیب نقش مهمی در عفونت‌زایی پاتوژن‌ها دارد (۸) و (۲۷). امروزه محققان در حال جستجوی راه حل‌های جدید برای درمان باکتری‌های مقاوم به دارو هستند. یکی از زمینه‌های کاربردی؛ نانویوتکنولوژی و استفاده از نانوذرات در درمان عفونت‌های میکروبی می‌باشد (۹). استفاده از ترکیبات پلی‌سارکاریدی زیست تخریب‌پذیر برای تشکیل نانو ذرات دارویی در حال حاضر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. یکی از این ترکیبات کیتوسان است. کیتوسان کوپلیمری از گلوکزآمین و N-استیل - گلوکزآمین با یک پرایمر آمینو و دو گروه هیدروکسیل آزاد برای هر واحد ساختاری C6 می‌باشد. این گروه‌های آمینوی آزاد به ایجاد بار مثبت در کیتوسان کمک می‌کنند که امکان واکنش با سطوح با بار منفی مثل باکتری‌ها و پلیمرهای آنیونی را فراهم می‌کند (۱۰). با وجود اینکه تعدادی از تحقیقات انجام شده عدم فعالیت آنتی‌باکتریال کیتوسان را گزارش کرده‌اند اما تحقیقات متعددی توانایی کیتوسان برای حفظ حیات میوه‌ها و سبزیجات و جلوگیری از فساد میکروبی را ثابت کرده‌اند. از این رو فعالیت ضد میکروبی کیتوسان در تنوع گسترده‌ی قارچی و باکتریایی مورد توجه قرار گرفته است. برای

عفونت‌های بیمارستانی یک مشکل جدی در مراکز بهداشتی و درمانی می‌باشد و هر ساله هزینه‌های زیادی را به بیماران و مراکز بهداشتی و درمانی تحمیل می‌کنند (۱). امروزه کنترل عفونت‌های بیمارستانی به دلیل رشد روزافزون جمعیت و در نتیجه تراکم و شلوغی بیشتر مراکز تشخیصی و درمانی، افزایش بیماران با نقص سیستم ایمنی و بیماری‌های مزمن و ظهور میکروارگانیسم‌های نوپدید و مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها از اولویت‌های حیاتی سیستم‌های بهداشتی و درمانی هر کشور محسوب می‌شود (۲). اسیتوباکتر بومانی پاتوژن فرصت‌طلبی است که همواره به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای عفونت‌های بیمارستانی شناسایی شده است (۳). یکی از مشکلات عمده در درمان و پیشگیری از عفونت‌های ایجاد شده توسط اسیتوباکتر بومانی، مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی ایجاد شده در آن می‌باشد (۳). اسیتوباکتر بومانی مقاومت چند دارویی ایجاد می‌کند که این پدیده توسط انواع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مختلف ثابت شده است؛ از جمله فعال‌سازی پمپ‌های افلاکس، سنتز آنزیم‌هایی مثل فسفریل ترانسفرازها و استیل ترانسفرازها که باعث مقاومت به آمینو گلیکوزیدها می‌شود. علاوه بر موارد ذکر شده مکانیسم دیگری در مقاومت آنتی‌بیوتیکی اسیتوباکتر بومانی تحت عنوان بیوفیلیم وجود دارد (۴). بیوفیلیم، در حال حاضر به عنوان یکی از ترکیبات مهم مقاومت باکتری‌ها به اکثر کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی شناخته شده است. بیوفیلیم‌ها تجمع پیچیده‌ای از کلنی‌های میکروبی هستند و منجر به تشکیل یک ماتریکس سلولی که از یک لایه محافظ پلی‌ساکاریدی تشکیل شده است، می‌شوند (۵). سلول چسبنده در بیوفیلیم درون یک ماتریکس خارج سلولی قرار دارد که حاوی مواد پلیمری خارج سلولی (EPS) است. سلول‌های میکروبی اجزای اصلی بیوفیلیم‌ها هستند که EPS تولید می‌کنند که شامل ۵۰ تا ۹۰ درصد کل کربن آلی موجود در بیوفیلیم‌ها است (۶). لذا تشکیل بیوفیلیم عامل اصلی دخیل در بقاء و مقاومت باکتریایی است (۷). از سویی، نشان داده شده است که این پاتوژن در محیط بیمارستان اشیاء

دستیابی به خاصیت آنتی‌باکتریال کیتوسان، احتمالاً کیتوسان با غلظت بالاتر از ۵۰ درصد ارجحیت داشته باشد (۱۱). مشاهده شده است که فعالیت ضد میکروبی کیتوسان توسط استیک، فرمیک یا لاکتیک اسید در محیط، تقویت شده است. حلالیت در آب کیتوسان‌ها و فعالیت ضد میکروبی آنها بهم وابسته است (۱۲). کیتوسان‌های قابل حل در آب هیچ فعالیت ضد میکروبی نشان نمی‌دهند. برخلاف این، کیتوسان‌های غیر قابل حل و محلول در محیط اسیدی فعالیت‌های میکروب‌کشی نشان می‌دهند. واکنش بین مولکول‌های کیتوسان با بار مثبت و غشاهای سلولی میکروبی بار منفی می‌تواند منجر به تخریب آنها و کمبود ترکیبات داخل سلولی ضروری شود (۱۳). از آنجا که در زمان تشکیل بیوفilm هزینه‌های درمان بالا رفته و گران بودن در مان‌های فعلی و همچنین عدم کارایی کافی درمان‌های موجود، استفاده از نانوذرات کیتوسان برای درمان می‌تواند راهکار مناسبی تلقی شود (۱۴). با توجه به شیوع بالای عفونت‌های بیمارستانی ناشی از اسینتوباکتر بومانی و همچنین گسترش عوامل افزایش‌دهنده مقاومت مانند بیوفilm و نقش آن در ایجاد فنوتیپ مقاومت چند دارویی (MDR)، مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی حضور ژن CsuA در ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی انجام گرفت

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی ایزوله‌های باکتری: در این مطالعه توصیفی-مقطعی از اردیبهشت تا آبان ماه ۱۳۹۹، ۱۰۰ ایزوله از خون، ادرار، تراشه، خلط، چرک و زخم بیماران بستری در بیمارستان‌های مختلف با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۹۵ درصد و میزان خطای ۵ درصد جمع‌آوری گردید. در آزمایشگاه هر ایزوله روی محیط‌های مک کانکی آگار و بلاد آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. سپس، با آزمایش مستقیم (رنگ آمیزی گرم) وجود کوکوباسیل‌های گرم منفی

اسینتوباکتر به روش میکروسکوپی تأیید شد. برای تشخیص گونه‌های مختلف اسینتوباکتر تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز و اکسیداز، SIM، VP، OF، TSI، اوره‌آز و رشد در ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. ایزوله‌هایی که غیر متحرک، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، اندول منفی، پیگمان منفی، اوره‌آز منفی، سیترات مثبت، S2H منفی و VP منفی بودند به عنوان اسینتوباکتر بومانی جداسازی شدند. همچنین برای تأیید نهایی ایزوله‌ها، ژن ۱۶ SrRNA که به صورت ذاتی در اسینتوباکتر بومانی وجود دارد توسط پرایمر اختصاصی به روش واکنش زنجیره پلیمراز در تمامی ایزوله‌ها شناسایی گردید (جدول شماره ۱).

سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای تعیین فنوتیپ MDR: تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جمع‌آوری شده با آزمون آنتی‌بیوگرام و با روش دیسک دیفیوژن با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی ساخت شرکت (Padtanteb, Iran) (بر روی محیط مولر هینتون آگار (Merck Germany) و بر طبق دستورالعمل CLSI2019 انجام گردید. در این تست ایزوله‌هایی که به بیش از ۳ کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاوم باشند به عنوان فنوتیپ MDR شناخته می‌شوند (۱۵). آنتی‌بیوتیک‌های آزمون شده شامل: توبرامایسین (۱۰ میکروگرم)، سفپیم (۳۰ میکروگرم)، ایمپنم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفزازیدیم (۳۰ میکروگرم) بودند. این روش مطابق با دستورالعمل CLSI2019 (https://clsi.org/media/3062/clsi-update-2019_21819_final_fullsizedhandouts.pdf) انجام شد.

ارزیابی ژنوتیپی حضور ژن CsuA:

الف) استخراج DNA به روش Boiling

برای استخراج DNA، مقدار ۱ میلی‌لیتر از باکتری کشت شده در محیط براث به میکروتیوپ منتقل شده و

دو بار تقطیر و ۳ میکرولیتر از DNA الگو اضافه و حجم نهایی ترکیبات به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد و مخلوط در دستگاه ترموسایکلر (Techne, United Kingdom; 5PRIMEG /0.2) قرار گرفت. برنامه اجرایی سیکل های PCR ژن CsuA به ترتیب زیر بود: واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل حرارتی شامل واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر به DNA الگو در ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، طویل شدن رشته الگو در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و دمای طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. الکتروفورز محصولات PCR توسط ژل ۱ درصد حاوی رنگ گرین-ویور [CinnaGen] در ولتاژ ۱۲۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه تنظیم شده و پس از گذشت این زمان باندها توسط دستگاه ژل ترنس لومیناتور (E-BOX_VX5) عکس برداری شدند. برای کنترل مثبت از (A. baumannii ATCC19606) و برای کنترل منفی از میکروتیوب حاوی مواد واکنش بدون DNA الگو استفاده گردید.

به مدت ۱ دقیقه با دور rpm 12000 سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت دور ریخته شده و رسوب حاصل از باکتری در ۱۰۰ میکرولیتر آب استریل حل شده و به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد (۱۶). پس از انجام مراحل استخراج DNA، نمونه ها تا زمان انجام PCR در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. تعیین کمیت DNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ- (Thermo 2000c) بررسی شدند.

(ب) واکنش زنجیره ای پلیمرز مولتیپلکس (Multiplex-PCR) به منظور بررسی حضور ژن CsuA و SrRNA۱۶ از واکنش زنجیره ای پلیمرز استفاده شد. بدین منظور از توالی های اولیگونوکلئوتیدی پرایمر اختصاصی برای ژن های مذکور استفاده شد (جدول شماره ۱). پرایمرهای اختصاصی توسط برنامه primer3 و نرم افزار Oligo7 طراحی شدند و در نهایت پرایمرهایی که دمای اتصال مشابه داشتند به عنوان پرایمرهای هدف مورد استفاده قرار گرفتند. در این پژوهش از مخلوط واکنش (Master mix_YTA) استفاده گردید که شامل ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (CinnaGen)، ۱۲ میکرولیتر مخلوط واکنش، ۸ میکرولیتر آب مقطر

جدول شماره ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در PCR

| ژن هدف | کد دسترسی | توالی ها | محصول (bp) | دمای اتصال |
|-------------|------------|--------------------------------------------------------------------|------------|------------|
| CsuA | AY241696.1 | F: 5'- TCAAGCAACCCATGATGGTA -3' R: 5'- AAATACCCGAATTTGCACCA -3' | 809 | 57 |
| CsuA/RT-PCR | AY241696.1 | F: 5'- ATTAAAGCAGGCGAGAAGCA -3' R: 5'- CTGCCAATTCCTTTCCATA -3' | 198 | 57 |
| 16S rRNA | LN611374.1 | 5'- CAGCTCGTGTCTGAGATGT -3':F 5'- GCCTTCCTCCAGTTTGTAC -3':R | 118 | 57 |

پس از طی دوره گرماگذاری، محتوای هر چاهک آسپیره شد و چاهک ها ۵ بار با بافر فسفات سالین استریل شستشو داده شدند تا همه سلول های پلانکتونیک خارج شوند. پس از خشک شدن چاهک ها، در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد به چاهک ها اضافه شد و پس از ۵ دقیقه از

به منظور بررسی توانایی تشکیل بیوفیلیم سویه ها از روش کمی صفحه کشت بافت (TCP) استفاده شد. سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک فارلند در محیط نوترینت برات آماده شد و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر در هر چاهک ریخته شد. میکروتیتر پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند.

جدا یه‌ها با جذب نوری کنترل مقایسه و به صورت بیوفیلم‌های قوی، متوسط، ضعیف و منفی گزارش شد. *Pseudomonas aeruginosa* PA01 به عنوان کنترل مثبت در آزمایش‌های بررسی تشکیل بیوفیلم استفاده شد (۲، ۴ و ۲۸).

چاهک‌ها آسپیره شده و توسط آب شسته شدند. پس از خشک شدن چاهک‌ها، به منظور رنگ بری به مقدار ۱۶۰ میکرولیتر استیک اسید ۳۳٪ به چاهک‌ها اضافه شد. در نهایت توسط دستگاه ELISA plate reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. سپس طبق جدول شماره ۲ جذب نوری (OD)

جدول شماره ۲. طبقه‌بندی باکتری‌ها براساس توانایی تشکیل بیوفیلم

| نتایج | نتایج این مطالعه | فرمول محاسبه کلاس بیوفیلمی |
|---------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------|
| بیوفیلم قوی | نمونه $OD > 0.2$ | $OD > 4 \times OD_c$ |
| بیوفیلم متوسط | $0.1 < OD \leq 0.2$ نمونه | $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ |
| بیوفیلم ضعیف | $0.05 < OD \leq 0.1$ نمونه | $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ |
| بیوفیلم منفی | نمونه $OD \leq 0.05$ | $OD \leq OD_c$ |
| | | $OD_c = 0.05$ $2 \times OD_c = 0.1$ $4 \times OD_c = 0.2$ |

چاهک‌ها با استفاده از دستگاه قرائت گر ایزا در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانش شد.

بررسی کمی اثرات ضد بیوفیلمی نانوذره کیتوسان: اثرات کمی ضد بیوفیلمی نانوذرات کیتوسان با استفاده از روش میکروتیتربلیت و با غلظت subMIC نانوذره استفاده شد. محیط کشت نوترینت برات به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک ریخته شد. سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک فارلند در محیط نوترینت برات آماده شد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به میکروتیوپ ۱/۵ اضافه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت MIC نانوذره کیتوسان به میکروتیوپ اضافه شده و پی‌پتاژ شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروتیوپ در هر چاهک ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. پس از طی دوره گرماگذاری، محتوای هر چاهک آسپیره شد و چاهک‌ها ۵ بار با بافر فسفات سالین استریل شستشو داده شدند تا همه سلول‌های پلانکتونیک خارج شوند. پس از خشک شدن چاهک‌ها، در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد به چاهک‌ها اضافه و پس از ۵ دقیقه از چاهک‌ها آسپیره شده و توسط آب شسته شدند. پس از خشک شدن چاهک‌ها، به منظور رنگ بری به مقدار ۱۶۰ میکرولیتر استیک اسید ۳۳٪ به چاهک‌ها اضافه شد. در نهایت توسط دستگاه ELISA plate reader در طول

محلول‌سازی نانوذرات کیتوسان:

نانوذرات کیتوسان با اندازه ۵۰ نانومتر و خلوص ۹۹/۹۹٪ از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان تهیه شد. جهت محلول‌سازی پودر نانوذرات کیتوسان، ابتدا محلول استیک اسید ۱٪ تهیه شد. به این ترتیب که در یک فالدکون ۱۰۰ میلی لیتر، ۹۹ میلی لیتر آب مقطر و ۱ میلی لیتر استیک اسید خالص اضافه شد. سپس جهت تهیه غلظت بالای نانوذرات کیتوسان، مقدار ۴۰۰ میلی گرم از پودر نانوذره کیتوسان به محلول استیک اسید اضافه شد. به این ترتیب غلظت ۱:۴۰ کیتوسان آماده شده و برای بررسی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت (۲ و ۴).

آزمون میکروداپلوشن برات برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) کیتوسان:

برای تعیین MIC از روش رقت‌گیری سریالی به صورت سه تکرار در محیط کشت انجام شد. بدین صورت که رقت‌های مختلف ۱۰۰٪ (۴ میلی گرم بر میلی لیتر) تا ۶/۲۵٪ (۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) از نانوذرات کیتوسان به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک شب در گرمخانه جایگذاری شدند. یک چاهک بعنوان بلانک (محیط کشت خالی) استفاده شد. در نهایت کدورت تمام

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، ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه بود. همچنین از سویه ATCC19606 اسپیتوباکتر بومانی به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

آنالیز آماری:

در این پژوهش محاسبه آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام گردید و نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت بیان ژن‌های هدف، بین نمونه‌های کنترل و بیمار شده با روش آماری Tukey's HSD post-hoc test محاسبه گردید. اطلاعات به صورت $mean \pm standard deviation$ (M \pm SD) نمایش داده شده و مرز معنی‌داری روی $P < 0.05$ و $P < 0.01$ قرار گرفته شد.

یافته ها

ایزوله‌های انتخاب شده:

از ۱۰۰ نمونه جمع آوری شده با توجه به تست‌های میکروسکوپی، بیوشیمیایی و شناسایی مولکولی ژن ۱۶SrRNA تعداد ۲۹ نمونه اسپیتوباکتر بومانی از بیماران بستری به دست آمد که براساس نوع نمونه انتخاب شد که مشخصات جدایه‌ها با توجه به نوع نمونه در جدول شماره ۳ ارائه شده است.

موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. سپس طبق جدول شماره ۲ جذب نوری (OD) جدایه‌ها با جذب نوری کنترل مقایسه و قدرت تشکیل بیوفیلم هر سویه تیمار شده با نانوذره کیتوسان نسبت به سویه‌های تیمار نشده مقایسه شد.

بررسی بیان ژن CsuA به کمک Real-Time PCR:

استخراج RNA از باکتری اسپیتوباکتر بومانی به منظور بررسی بیان ژن‌های AB-16S-rRNA و CsuA پس از تیمار با غلظت subMIC نانوذرات کیتوسان صورت گرفت. استخراج RNA توسط کیت RNX plus تهیه شده از شرکت سیناژن انجام گرفت. ساخت cDNA از روی RNA استخراج شده، پس از تعیین مقدار و غلظت RNA حاصل از سلول‌های بیوفیلم مثبت اسپیتوباکتر بومانی تیمار شده توسط دستگاه نانودراپ، مطابق با کیت فرمنتاز (YTA cDNA Synthesis Kit, IRAN) انجام گرفت.

در این پژوهش برای انجام تست RealTime PCR از کیت SYBER green شرکت یکتاتجهیز آزما (YTA) استفاده شد و نرمالیزاسیون داده‌ها با ژن ۱۶ rRNA به عنوان ژن مرجع [کنترل داخلی] انجام شد که جهت بررسی بیان ژن CsuA در باکتری-های تیمار شده با نانوذرات کیتوسان بررسی شد. بر طبق پروتکل مسترمیکس، پرایمرها و cDNA سنتز شده در حجم مناسبی مخلوط شده و واکنش توسط دستگاه Corbet Real-time PCR انجام گردید. حجم واکنش ۱۵ میکرولیتر و شامل cDNA، پرایمر جلوبر و برگشتی برای هر دو ژن CsuA و ۱۶ s rRNA، مسترمیکس و آب مقطر دوبار تقطیر استریل بود.

جدول شماره ۳. مشخصات مربوط به تعداد و پراکنش نوع نمونه در بین ایزوله‌های اسپیتوباکتر بومانی

| محل جداسازی نمونه | تعداد ایزوله‌های جدا شده از بیماران | تعداد ایزوله‌های اسپیتوباکتر بومانی |
|-------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| خون | ۳۱ | ۹ |
| ادرار | ۱۹ | ۷ |
| خلط | ۱۷ | ۵ |
| زخم | ۱۳ | ۴ |
| چرک | ۱۱ | ۲ |
| تراشه | ۹ | ۲ |

آمیکاسین (۳۴/۴۸٪) بود. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله اسیتوباکتر بومانی در جدول شماره ۴ نشان می‌دهد تمام سویه‌ها حداقل به ۳ کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاوم بوده و فنوتیپ MDR را نشان می‌دهند.

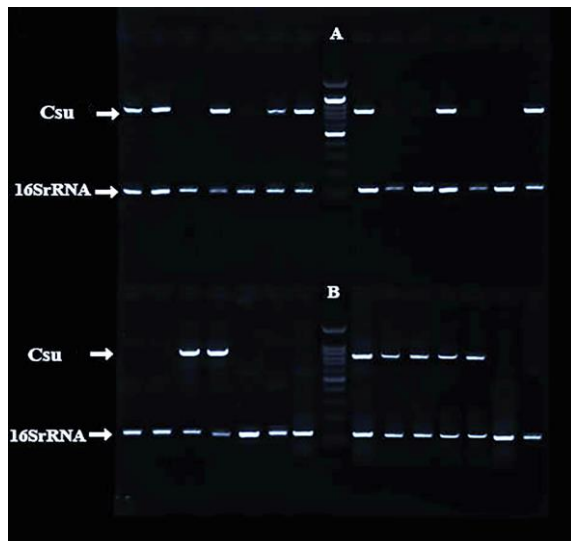
ارزیابی فنوتیپی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی: ارزیابی فنوتیپی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های اسیتوباکتر بومانی نشان داد که بیشترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم (۷۵/۸۶٪) و ایمی-پنم (۷۲/۴۱٪) و کمترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک

جدول شماره ۴. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های اسیتوباکتر بومانی

| آنتی‌بیوتیک | فراوانی/درصد سویه‌های حساس (S) | فراوانی/درصد سویه‌های حد واسط (I) | فراوانی/درصد سویه‌های مقاوم (R) |
|----------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| سفییم | ۸ (۲۷/۵۸) | ۱ (۳/۴۶) | ۲۰ (۶۸/۹۶) |
| توبرامایسین | ۱۱ (۳۷/۹۴) | ۲ (۶/۸۹) | ۱۶ (۵۵/۱۱۷) |
| مروپنم | ۱۰ (۳۴/۴۸) | ۲ (۶/۸۹) | ۱۷ (۵۸/۹۳) |
| ایمی‌پنم | ۳ (۱۰/۳۵) | ۵ (۱۷/۲۴) | ۲۱ (۷۲/۴۱) |
| آمیکاسین | ۸ (۲۷/۵۸) | ۱۱ (۳۷/۹۴) | ۱۰ (۳۴/۴۸) |
| جنتامایسین | ۵ (۱۷/۲۴) | ۴ (۱۳/۷۹) | ۱۹ (۶۵/۱۵۱) |
| سفوتاکسیم | ۹ (۳۱/۱۰۲) | ۳ (۱۰/۳۵) | ۱۷ (۵۸/۹۳) |
| سیپروفلوکساسین | ۱۱ (۳۷/۹۴) | ۳ (۱۰/۳۵) | ۱۵ (۵۱/۷۲) |
| سفنازیدیم | ۴ (۱۳/۷۹) | ۳ (۱۰/۳۵) | ۲۲ (۷۵/۱۸۶) |
| فنوتیپ | --- | --- | MDR |

نتایج آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ژن‌های 16SrRNA و CsuA:

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نشان داد که فراوانی ژن 16SrRNA در تمامی ۲۹ نمونه (۱۰۰ درصد) ردیابی شد. این نمونه‌ها به عنوان ایزوله اسیتوباکتر بومانی شناسایی شدند. همچنین فراوانی ژن CsuA برابر با ۱۵ ایزوله (۵۱/۷۲٪) بود (شکل شماره ۱)



شکل شماره ۱. نتایج Multiplex-PCR نشان دهنده حضور ژن CsuA در ۵۱/۷۲ ایزوله‌های اسیتوباکتر بومانی بود. (A و B) نشان دهنده DNA Ladder 100bp است.

بررسی رابطه‌ی بین حضور ژن Csua و توانایی تولید بیوفیلیم:

رابطه‌ی بین حضور ژن Csua و توانایی تولید بیوفیلیم بررسی شد. در این بررسی از بین ۲۹ ایزوله بررسی شده، ۸ ایزوله با مقاومت چندگانه دارویی توانایی تشکیل بیوفیلیم

قوی، ۵ نمونه توانایی تشکیل بیوفیلیم متوسط و ۲ نمونه توانایی تشکیل بیوفیلیم ضعیف را داشتند. ۱۴ ایزوله بیوفیلیم منفی بوده و توانایی تشکیل بیوفیلیم نداشتند. مطابق با روش PCR، ۱۰۰٪ ایزوله‌های تشکیل دهنده بیوفیلیم (۱۵ ایزوله)، دارای ژن Csua بودند (جدول شماره ۵).

جدول شماره ۵. رابطه‌ی بین حضور ژن Csua و توانایی و قدرت تولید بیوفیلیم

| مشخصه فنوتیپی | دامنه جذب نوری ایزوله‌ها پس از آزمون TCP | تعداد ایزوله | حضور ژن Csua |
|----------------|------------------------------------------|--------------|--------------|
| بیوفیلیم منفی | $OD \leq 0.05$ | ۱۴ | منفی |
| بیوفیلیم ضعیف | $0.05 < OD \leq 0.1$ | ۲ | مثبت |
| بیوفیلیم متوسط | $0.1 < OD \leq 0.2$ | ۵ | مثبت |
| بیوفیلیم قوی | $0.2 < OD$ | ۸ | مثبت |

نتایج تعیین MIC نانوذرات کیتوسان علیه سویه‌های بیوفیلیم مثبت: سویه‌های بیوفیلیم مثبت تحت تاثیر غلظت‌های ۶/۲۵ تا

۱۰۰ درصد از نانوذرات کیتوسان در مدت زمان ۲۴ ساعت قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سویه‌های مختلف دارای محدوده‌ای از MIC بودند (جدول شماره ۶).

جدول شماره ۶. نتایج تعیین MIC نانوذرات کیتوسان علیه سویه‌های بیوفیلیم مثبت

| شماره سویه | غلظت MIC (میلی گرم بر میلی لیتر) | درصد MIC | قدرت تشکیل بیوفیلیم |
|------------|----------------------------------|----------|---------------------|
| A1 | ۴:۱ | ۱۰۰٪ | قوی |
| A2 | ۱:۱ | ۲۵٪ | ضعیف |
| A4 | ۴:۱ | ۱۰۰٪ | قوی |
| A6 | ۲:۱ | ۵۰٪ | متوسط |
| A7 | ۴:۱ | ۱۰۰٪ | قوی |
| A8 | ۴:۱ | ۱۰۰٪ | قوی |
| A11 | ۲:۱ | ۵۰٪ | متوسط |
| A14 | ۴:۱ | ۱۰۰٪ | قوی |
| A17 | ۲:۱ | ۵۰٪ | متوسط |
| A18 | ۲:۱ | ۵۰٪ | متوسط |
| A22 | ۱:۱ | ۲۵٪ | ضعیف |
| A23 | ۴:۱ | ۱۰۰٪ | قوی |
| A24 | ۴:۱ | ۱۰۰٪ | قوی |
| A25 | ۲:۱ | ۵۰٪ | متوسط |
| A26 | ۴:۱ | ۱۰۰٪ | قوی |
| ATCC19606 | ۱:۱ | ۲۵٪ | ضعیف |

بررسی کمی اثرات ضد بیوفیلیمی نانوذره کیتوسان با روش تست میکروتیتراپلیت:

ارزیابی کمی اثرات ضد بیوفیلیمی نانوذرات کیتوسان با کمک روش میکروتیتراپلیت انجام گرفت. نتایج این

بحث و نتیجه گیری

به علت افزایش روزافزون مقاومت دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در سال‌های اخیر، شاهد حضور ایزوله‌هایی از اسینتوباکتر بومانی با الگوی مقاومت دارویی چندگانه (MDR) هستیم که از نقاط مختلف جهان گزارش می‌شوند (۱۷). افزایش مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی و محدود بودن گزینه‌های درمانی، مشکلات جدی در مراکز درمانی به ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه است که سلامت و اقتصاد کشور را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۸). توانایی چسبیدن و تشکیل بیوفیلم روی مخاط و وسایل پزشکی یکی از فاکتورهای اصلی ویرولانسی و مقاومت دارویی در گونه‌های اسینتوباکتر است. بیوفیلم باکتریایی باعث می‌شود تا باکتری در برابر عواملی چون حضور آنتی‌بیوتیک‌ها، پاسخ ایمنی میزبان، عوامل فاگوسیت‌کننده و استرس‌های محیطی مقاومت کند (۱۹). مطالعه توانایی تشکیل بیوفیلم و مشخص کردن ژن‌های دخیل در آن در ایزوله‌های مختلف اسینتوباکتر می‌تواند به فهم بهتر فرایند تشکیل بیوفیلم کمک کند. بنابراین از اهداف مهم این تحقیق، بررسی میزان تشکیل بیوفیلم در سویه‌های بالینی اسینتوباکتر بومانی مقام به آنتی‌بیوتیک بوده است. مطالعه حاضر نشان داد که اکثریت ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی الگوی مقاومت دارویی چندگانه دارند. به طوری که بیشترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم (۷۵/۸۶٪) و ایمپنم (۷۲/۴۱٪) و کمترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین (۳۴/۴۸٪) ارزیابی شد. حضور ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی با الگوی مقاومت دارویی چندگانه در دیگر مطالعات انجام شده در ایران نیز گزارش شده است. به طوری که در مطالعه حاتمی و همکاران در سال ۲۰۱۸، ۸۴ درصد از ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی مقاومت دارویی چندگانه را نشان دادند (۲۰)؛ و در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۱۸ فراوانی اسینتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو ۷۶ درصد بود (۱۴). در مطالعه‌ای که گودرزی و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام دادند مقاومت به سفنازیدیم و مروپنم ۹۹ درصد و ایمپنم

۹۱/۵ درصد (۲۱) و در مطالعه کوتی و همکاران در سال ۲۰۱۵ مقاومت به سفنازیدیم و مروپنم ۹۹/۵ درصد و ایمپنم ۹۸/۵ درصد گزارش شد (۲۲). تمام این مطالعات نشان دهنده مقاومت بسیار بالای این باکتری نسبت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف است که با مطالعه ما همسو می‌باشد. به طور کلی میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در کشورهای آسیایی و اروپایی به نسبت ایالت متحده آمریکا و کشورهای آمریکای لاتین در سطح بالاتری است که این میزان مقاومت دارویی در ایران بسیار نگران‌کننده است (۲۱). بسیاری از مطالعات نشانگر قدرت بقای اسینتوباکتر بومانی در شرایط محیطی سخت و مقاومت بسیار بالا در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف ناشی از تشکیل بیوفیلم هستند (۱۴، ۲۳). ژن *CsuA* از جمله مهم‌ترین ژن‌های ایجاد کننده و تقویت کننده بیوفیلم در اسینتوباکتر بومانی است. این پروتئین با وزن مولکولی بالا در سطح خارجی باکتری‌ها قرار دارد و شامل هسته مرکزی متشکل از تکرارهای متوالی از توالی‌های مشابه است. *CsuA* یک پروتئین در سطح خارجی *A. baumannii* می‌باشد که شامل هسته‌ی مرکزی در ارتباط با انواع پروتئین‌های دخیل در مقاومت می‌باشد. این پروتئین به باکتری قابلیت تشکیل بیوفیلم و اتصال به سطوح را می‌دهد و به این ترتیب نقش مهمی در عفونت‌زایی پاتوژن‌ها دارند (۶). در سال‌های اخیر محققان بسیاری به بررسی ارتباط بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی اسینتوباکتر بومانی و ژن‌های دخیل در تولید بیوفیلم این باکتری پرداختند الکیو و همکاران در سال ۲۰۱۶ مطالعه‌ای مبنی بر ارتباط بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تشکیل بیوفیلم و مقاومت ویژه بیوفیلم در اسینتوباکتر بومانی انجام دادند. در مطالعه آنها ارتباط بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تشکیل بیوفیلم و مقاومت ویژه بیوفیلم در ایزوله‌های بالینی اسینتوباکتر بومانی بررسی گردید (۲۴). در مطالعه حاضر فراوانی ژن *CsuA*، ۵۱/۷۲ درصد بود در حالی که در مطالعات خارج از ایران فراوانی این ژن درصد گزارش شده است. وجود عدم همخوانی شیوع این ژن در مطالعات خارج از ایران با مطالعه

حاضر می‌تواند به دلیل شرایط جغرافیایی متفاوت، تعداد و یا تنوع نمونه‌ها باشد. همچنین در این مطالعه به منظور بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم از روش میکروتیتر پلیت استفاده شد. روش میکروتیتر پلیت علاوه بر اینکه توانایی تشکیل بیوفیلم ایزوله‌ها را تشخیص می‌دهد، می‌تواند میزان تشکیل بیوفیلم را به صورت کمی اندازه‌گیری کند. با استفاده از این روش، در مطالعه حاضر، ۵۱/۷۲ درصد از ایزوله‌ها بیوفیلم تشکیل دادند و ۱۰۰ درصد از ایزوله‌های بیوفیلم مثبت دارای ژن CsUA بودند. این نتایج مشابه با یافته‌های مطالعه خیر و همکاران بود. در این مطالعه که در سال ۲۰۱۵ انجام شد، ۵۱/۳ درصد ایزوله‌های بیوفیلم مثبت، و ۴۸/۷ درصد ایزوله‌های بیوفیلم منفی گزارش شدند (۲۵). توانایی فوق‌العاده‌ی کیتوسان به عنوان عامل زیست تخریب‌پذیر، محققان زیادی را به فکر استفاده از این ماده به عنوان عامل ضد میکروبی واداشته است. تحقیقات مختلفی نشان دادند که نانوذرات توانایی چشمگیری در مهار بیماری‌های عفونی باکتریایی دارند. طبق تحقیقات القطانی و همکاران در سال ۲۰۲۰ در خصوص سنتز نانوذرات کیتوسان و بررسی اثرات آنتی-باکتریال آن، مشخص شد که نانوذرات کیتوسان پتانسیل استفاده به عنوان داروی آنتی‌باکتریال را دارد (۲۶). نتایج این مطالعه همسو با مطالعه القطانی بیانگر این است که نانوذرات کیتوسان پتانسیل آنتی‌باکتریال دارد. بیان ژن CsUA در اسیتوباکتر بومانی پس از تیمار با نانوذره کیتوسان کاهش قابل تأثیری داشت. کاهش بیان ژن باعث عملکرد ضعیف بیوفیلم شده و از میزان مقاومت زیاد آنتی-بیوتیک‌ها و سایر مواد ضد عفونی کننده و دارویی جلوگیری گردید. بنابراین پیشنهاد می‌شود نانوذرات کیتوسان به عنوان داروی مناسب آنتی‌باکتریال استفاده شده و به عنوان نگهدارنده مواد غذایی جایگزین مواد شیمیایی و مضر گردد. به طور کلی در این مطالعه تمامی ایزوله‌های تولیدکننده بیوفیلم قوی، متوسط و ضعیف حاوی ژن CsUA بودند. با توجه به فراوانی بالای توانایی تشکیل بیوفیلم قوی در ایزوله‌های مورد بررسی، این احتمال وجود

دارد که ساختار بیوفیلم از دلایل اصلی ایجاد این میزان از مقاومت و بروز فنوتیپ MDR باشد.

به طور خلاصه، کیتوسان به عنوان یک سیستم دارویی مبتنی بر پلیمر استیل‌شده از کیتین خوراکی که از پوسته سخت میگو جدا می‌شود، نتایج امیدوار کننده‌ای برای استفاده به عنوان عامل ضد باکتری طبیعی در برابر سویه-های MDR نشان داد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود که جهت استفاده از نانوذرات کیتوسان به عنوان یک استراتژی جدید فازهای کلینیکی و بالینی در صنعت داروسازی مطالعات بیشتری انجام گردد. همچنین بررسی نانوذرات کیتوسان در ترکیب با عصاره‌های گیاهی می‌تواند به عنوان رویکردهای آنتی‌باکتریال آینده پیشنهاد گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمامی افرادی که همکاری صمیمانه در این پژوهش داشتند، کمال امتنان را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی ندارند.

کد اخلاق:

این پژوهش مطابق با کمیته اخلاقی و معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به شماره IR.IAU.SHK.REC.1399.057 انجام شد.

References

- Lemiech-Mirowska E, Kiersnowska ZM, Michalkiewicz M, Depta A, Marczak M. Nosocomial infections as one of the most important problems of healthcare system. *Ann Agric Environ Med* 2021;28. doi: 10.26444/aaem/122629.
- Piri Gharaghie T, Sadat Shandiz SA, Beiranvand S. Evaluation of silver nanoparticles effects on bla-per1 gene expression for biofilm formation in isolates of antibiotic-resistant *Acinetobacter Baumannii* by real time PCR method. *JCMR* 2022; 35:349-66.
- Nocera FP, Attili AR, De Martino L. *Acinetobacter baumannii*: its clinical significance in human and veterinary medicine. *Pathogens* 2021; 10:127. doi: 10.3390/pathogens10020127.
- Piri Gharaghie T, Sadat Shandiz SA. The inhibitory effects of silver nanoparticles on *bap* gene expression in antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates using real-time PCR. *J Ilam Uni Med Sci* 2018;26: 175-85. doi: 10.29252/sjimu.26.4.175.
- Bowler P, Murphy C, Wolcott R. Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship? *Antimicrob Resist Infect Control* 2020; 9:1-5. doi: 10.1186/s13756-020-00830-6.
- Piri-Gharaghie T, Doosti A, Mirzaei SA. Identification of antigenic properties of *Acinetobacter baumannii* proteins as novel putative vaccine candidates using reverse vaccinology approach. *Appl Biochem Biotechnol* 2022; 194:4892-914. doi: 10.1007/s12010-022-03995-5.
- Pakharukova N, Garnett JA, Tuittila M, Paavilainen S, Diallo M, Xu Y, et al. Structural insight into archaic and alternative chaperone-usher pathways reveals a novel mechanism of pilus biogenesis. *PLoS Pathog* 2015;11: e1005269. doi: 10.1371/journal.ppat.1005269.
- Gaddy JA, Actis LA. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol* 2009;4: 273-8. doi: 10.2217/fmb.09.5.
- Piri-Gharaghie T, Beiranvand S, Riahi A, Shirin NJ, Badmasti F, Mirzaie A, et al. Fabrication and characterization of thymol-loaded chitosan nanogels: improved antibacterial and anti-biofilm activities with negligible cytotoxicity. *Chem Biodivers* 2022;19: e202100426. doi: 10.1002/cbdv.202100426.
- Piri-Gharaghie T, Doosti A, Mirzaei SA. Fabrication and characterization of pcDNA3.1 (+) location within chitosan/nanoparticles complexes for enhanced gene delivery. *Iran J Biotechnol* 2022; 20:88-100. doi: 10.30498/ijb.2022.297534.3110.
- Donsi F, Annunziata M, Sessa M, Ferrari G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Sci Technol* 2011; 44:1908-14. doi:10.1016/j.lwt.2011.03.003.
- Chou SF, Gunaseelan S, Kiellani MH, Thottampudi VV, Neuenschwander P, Nie H. A review of injectable and implantable biomaterials for treatment and repair of soft tissues in wound healing. *J Nanotechnol* 2017;2017. doi:10.1155/2017/6341710.
- Van Vuuren SF, du Toit LC, Parry A, Pillay V, Choonara YE. Encapsulation of essential oils within a polymeric liposomal formulation for enhancement of antimicrobial efficacy. *Nat Prod Commun* 2010; 5:1934578X1000500912.
- Kabiri-Samani S, Sanatgaran M, Shojaei-Barjoei N, Moosavi R, Shaqaqi P, Kabiri H. Alternatives to Antibiotics GOAL: ELEVATING Antibiotic Resistance During the Post-COVID Period. *J Pers Med* 2022; 7:36-42. doi:10.22034/pmj.2022.253553
- Piri-Gharaghie T, Ghajari G, Hassanpoor M, Jegargoshe-Shirin N, Soosanirad M, Khayati S, et al. Investigation of antibacterial and anticancer effects of novel niosomal formulated Persian Gulf Sea cucumber extracts. *Heliyon* 2023;9. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e14149.
- Asadipour E, Asgari M, Mousavi P, piri gharaghie T, Ghajari G, Mirzaei A. Nano-Biotechnology and challenges of drug delivery system in cancer treatment pathway. *Chem Biodiver* 2023:e202201072. doi: 10.1002/cbdv.202201072.
- Taghiloo S, Ghajari G, Zand Z, Kabiri-Samani S, Kabiri H, Rajaei N, et al. Designing Alginate/Chitosan Nanoparticles Containing *Echinacea angustifolia*: A Novel Candidate For Combating Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chem Biodivers* 2023: e202201008. doi: 10.1002/cbdv.202201008.
- Zarinnezhad A, Shahhoseini MH, Piri Gharaghie T. Evaluating the relative frequency of fungal infections in the serum of patients with multiple sclerosis and healthy subjects using PCR. *Biolo J Microorganism* 2021; 10:37-50. doi:10.22108/bjm.2020.122265.1288.
- Piri-Gharaghie T, Doosti A, Mirzaei SA. Novel adjuvant nano-vaccine induced immune response against *Acinetobacter baumannii*. *AMB Express* 2023; 13:1-6. doi:10.1186/s13568-023-01531-0.
- Hatami R. The frequency of multidrug-resistance and extensively drug-resistant

- Acinetobacter baumannii* in west of Iran. *J Clin Microbiol Infect Dis* 2018; 1:4-8.
21. Goudarzi H, Douraghi M, Ghalavand Z, Goudarzi M. Assessment of antibiotic resistance pattern in *Acinetobacter baumannii* carrying bla_{oxA} type genes isolated from hospitalized patients. *Nov Biomed* 2013; 1:54-61. doi:10.22037/nbm.v1i2.5093.
 22. Kooti S, Motamedifar M, Sarvari J. Antibiotic resistance profile and distribution of oxacillinase genes among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Shiraz teaching hospitals, 2012-2013. *Jundishapur J Microbiol* 2015;8. doi: 10.5812/jjm.20215v2.
 23. Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol* 2014; 37:119-27.
 24. Qi L, Li H, Zhang C, Liang B, Li J, Wang L, et al. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol* 2016; 7:483. 10.3389/fmicb.2016.00483/full.
 25. Dadgar T, Vahedi Z, Yazdansetad S, Kiaei E, Asaadi H. Phenotypic Investigation of Biofilm Formation and the Prevalence of icaA and icaD Genes in *Staphylococcus epidermidis* Isolates. *Iran J Med Microbiol* 2019;12: 371-81. doi: 10.30699/ijmm.12.6.371.
 26. Alqahtani F, Aleanizy F, El Tahir E, Alhabib H, Alsaif R, Shazly G, et al. Antibacterial activity of chitosan nanoparticles against pathogenic *N. gonorrhoea*. *Int J Nanomedicine* 2020:7877-87. doi/full/10.2147/IJN.S272736.
 27. Gharaghie TP, Beiranvand S, Abbas Doosti AH, Ghadiri SH. A review of the epidemiology and clinical signs of SARS-COV-2. *NCMB J*. 2020; 11:103-20.
 28. Piri-Gharaghie T, Jegargoshe-Shirin N, Saremi-Nouri S, Khademhosseini SH, Hoseinnezhad-Lazarjani E, Mousavi A, et al. Effects of Imipenem-containing Niosome nanoparticles against high prevalence methicillin-resistant *Staphylococcus Epidermidis* biofilm formed. *Sci Rep* 2022; 12:5140. doi: 10.1038/s41598-022-09195-9.