

ارزیابی تأثیر ضدباکتریایی نانو دندریمر پلی آمیدوآمین-G5 بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس، سالمونلا تیفی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از محیط بیمارستانی

شهرام نظری^۱، سوسن باقری^۲، لیلا محمدی^۲، غریب مجیدی^۱، عزیز کامران^۳، اسرافیل عسگری^۴، پیمان آذغانی^۵، زهره درخوش^۶، زهره نظری^۷، سودابه علیزاده‌متبوع^{۸*}

۱. کارشناس ارشد مهندسی بهداشت محیط، دانشکده دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.
۲. کارشناس بهداشت محیط، دانشکده علوم پزشکی خلخال، عضو کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.
۳. استادیار گروه آموزش بهداشت، دانشکده علوم پزشکی خلخال، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.
۴. کارشناس ارشد مهندسی بهداشت محیط، مجتمع آموزشی عالی سلامت خوی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.
۵. کارشناس ارشد باکتری‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.
۶. کارشناس پرستاری، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران.
۷. کارشناس پرستاری، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.
۸. کارشناس بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، عضو کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۲۶

زمینه و هدف: هدف از این مطالعه بررسی آثار ضدباکتریایی نانو دندریمر پلی‌آمیدوآمین-G5 بر روی باکتری‌های اشرشیا کلی، پروتئوس میرابیلیس، سالمونلا تیفی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از محیط بیمارستانی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی اثر ضدباکتریایی نانو دندریمر پلی‌آمید و آمین-G5 به روش انتشار دیسک و رقت لوله‌ای بررسی شد. غلظت‌های مختلفی از نانو دندریمر پلی‌آمید و آمین-G5 بر روی دیسک‌های بلانک تلقیح شد و در داخل محیط کشت مولر هینتون آگار که در آن تلقیح باکتری‌ها مطابق با غلظت استاندارد ۰/۵ مک فارلند صورت گرفته بود، قرار داده شد، سپس هاله‌های عدم رشد بررسی شد. حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی نانو دندریمر پلی‌آمید و آمین-G5، به روش رقت لوله‌ای در محیط کشت نوترینت برات تعیین شود.

یافته‌ها: قطر هاله عدم رشد در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانو دندریمر پلی‌آمید و آمین-G5 برای اشرشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس، سالمونلا تیفی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب برابر ۲۲، ۲۸، ۲۱، ۱۶ و ۲۰ میلی‌متر بود. در مورد قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های گرم منفی با باکتری‌های گرم مثبت اختلاف معناداری مشاهده نشد ($p=0/2$). حداقل غلظت بازدارندگی برای پروتئوس میرابیلیس و سالمونلا تیفی برابر ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای اشرشیاکلی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس برابر ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی برای سالمونلا تیفی برابر ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای پروتئوس میرابیلیس، اشرشیا کلی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس برابر ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه، نانو دندریمر پلی‌آمید و آمین-G5 برای حذف اشرشیا کلی، پروتئوس میرابیلیس، سالمونلا تیفی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس بسیار موثر است.

کلیدواژه‌ها:

باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت، پلی‌آمیدوآمین-G5، تأثیر ضد باکتریایی، محیط بیمارستانی

* نویسنده مسئول: سودابه علیزاده‌متبوع

نشانی: دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

تلفن: ۰۹۱۴۹۵۳۹۱۷۳، دورنگار:

رایانه: Soudabehalizadeh@ymail.com

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۴، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۶، ص ۱۱۲-۱۲۰.

آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانامه: journal@medsab.ac.ir

شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی از علل مهم مرگ‌ومیر در سراسر دنیا به حساب می‌آیند و سالیانه مسئول ۴۲ تا ۹۸ هزار مرگ در ایالت متحده آمریکا هستند و هرساله هزینه‌ای بین ۱۷-۱۹ میلیون دلار را به خود اختصاص می‌دهند. آمار ابتلا به این عفونت‌ها در طی دو دهه اخیر تا ۳۶ درصد افزایش یافته است. این آمار در ایران از ۱/۹ درصد تا بیش از ۲۵ درصد گزارش شده است [۱]. سهم باکتری‌ها در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی ۹۰ درصد می‌باشد، عوامل قارچی، پروتوزوا و ویروسی نقش کمتری دارند. باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلی، گونه‌های پروتئوس و سالمونلا تیفی بیشترین سهم را در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی دارند [۲]. از میان این باکتری‌ها شایع‌ترین باکتری‌های مولد عفونت‌های بیمارستانی، انتروباکتریاسه‌های فرصت طلب هستند (به‌خصوص اشرشیاکلی) که در روده انسان زندگی می‌کنند و می‌توانند در صورت انتقال به مناطق استریل بدن باعث عفونت شوند [۳]. اشرشیاکلی عامل بیماری‌هایی چون باکتری، عفونت‌های مجاری ادراری، گاستروانتریت، مننژیت نوزادان و عفونت‌های درون شکمی هستند [۴-۷]. استافیلوکوک‌ها از جمله عوامل بیماری‌زای مهم برای انسان محسوب شده و موجب بروز گستره وسیعی از بیماری‌های خطرناک سیستمیک از جمله عفونت‌های پوستی، بافت‌های نرم، استخوان‌ها و مجاری ادراری در انسان می‌شوند [۴]. ضدعفونی کننده‌ها و گندزدهای شیمیایی در بیمارستان‌ها، کلینیک‌های درمانی و مطب‌ها برای کنترل اشیاء آلوده و بهداشتی کردن آنها برای مصارف بعدی، کاهش بار آلودگی میکروبی وسایل و دستگاه‌های مورد مصرف و جلوگیری از گسترش میکروارگانیسم‌های پاتوژن به کار می‌روند [۸]. الکل‌ها، ترکیبات حاوی کلر، یدوفورها، ترکیبات آمونوم ۴ ظرفیتی و ترکیبات فنولیک جزو ضدعفونی کننده‌هایی می‌باشند که مصارف زیادی در مراکز بهداشتی و درمانی دارند. درصد خلوص و دمای مناسب برای اثر گذاری اتانول بر روی باکتری‌ها به ترتیب ۷۰ درصد و ۳۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد که می‌تواند در مدت زمان ۱-۲ دقیقه آنها را از بین ببرد. ولی در غلظت‌های بالاتر و پایین‌تر از این، تأثیر کمتری دارد [۹ و ۱۰]. نانوذرات می‌توانند نقش مهمی در فرآیندهای گندزدایی ایفا کنند. بسیاری از نانوذرات از قبیل نانوذرات آهن صفر ظرفیتی [۱۱]، فتوکاتالیست دی‌اکسیدتیتانیوم، منیزیم اکسید، کلسیم اکسید، اکسید روی، چیتوزان، نانوذرات نقره، نانوذرات لوله‌های کربنی، نانوذندریمر، اکسید آلومینیوم برای غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌های موجود در آب آشامیدنی، فاضلاب، آبهای سطحی و دیگر منابع پیشنهاد شده‌اند [۱۲-۱۴]. دندریمرهای پلی‌آمیدوآمین که در مقیاس نانو می‌باشند [۱۵] دارای خاصیت ضدباکتریایی هستند که در مقایسه با سایر عوامل ضدباکتریایی

موجود کارایی بالاتری دارند [۱۶]. خاصیت ضد باکتریایی نانو دندریمرهای پلی‌آمیدوآمین اغلب به گروه‌های انتهایی آمینی آنها نسبت داده می‌شود. اثر ضد میکروبی نانو دندریمر پلی‌آمیدوآمین به فعل و انفعال الکترواستاتیکی میان بخش کاتیونی نانو دندریمر (گروه‌های انتهایی آمینی) و بخش آنیونی سطح سلول باکتری همراه با اختلال در دیواره سلولی و سرانجام لیز سلولی نسبت داده می‌شود [۱۷ و ۱۸]. هنگامی که نانو دندریمر به محلولی باکتریایی وارد می‌شود، جانشین یون‌های دو ظرفیتی سطحی باکتری‌ها از قبیل کلسیم و منیزیم می‌شود. سپس به غشاهای فسفولیپیدی دارای بار منفی متصل شده و باعث تغییر اندک در نفوذپذیری غشا می‌شود. غلظت بالاتر نانو دندریمر منجر به دناتور شدن پروتئین‌های غشایی شده و شروع به سوراخ کردن فسفولیپید می‌کند. در این مرحله، نفوذپذیری بالای غشاء باعث نشت یون‌های پتانسیم می‌شود. این غلظت از نانو دندریمر معادل اثر بازدارندگی است. اگر غلظت نانو دندریمر افزایش یابد، می‌تواند ساختار غشایی را بی‌ثبات‌تر کند. در نهایت غلظت‌های بالاتری از نانو دندریمر به فروپاشی کامل غشاء باکتریایی می‌انجامد. این غلظت از نانو دندریمر معادل اثر باکتری‌کشی است [۱۹ و ۲۰]. نانو دندریمرها به دلیل شباهت‌هایی که با برخی از پروتئین‌های بدن دارند، سمیت نسبتاً کمتری را بر روی سلول‌های یوکاریوتیک دارند [۲۱]. لذا ارزیابی خاصیت ضدباکتریایی نانو دندریمرها و امکان استفاده از آنها به‌عنوان گندزدا و ضدعفونی‌کننده، می‌تواند پژوهش شود. همچنین، با توجه به اینکه سهم باکتری‌ها در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی ۹۰ درصد می‌باشد و این باکتری‌ها دائماً در حال مقاوم شدن به انواع گندزداها و ضدعفونی‌کننده‌ها هستند [۲]. بنابراین این مطالعه با هدف تعیین اثر ضدباکتریایی نانو دندریمر پلی‌آمیدوآمین نسل پنجم (Nano Polyamidoamine-G5) روی باکتری‌های اشرشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس، سالمونلاتیفی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از محیط بیمارستانی انجام شد.

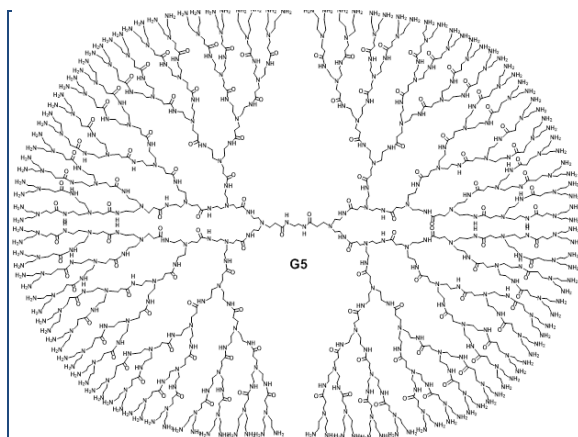
مواد و روش‌ها

مشخصات ماده ضد باکتریایی NPAMAM-G5

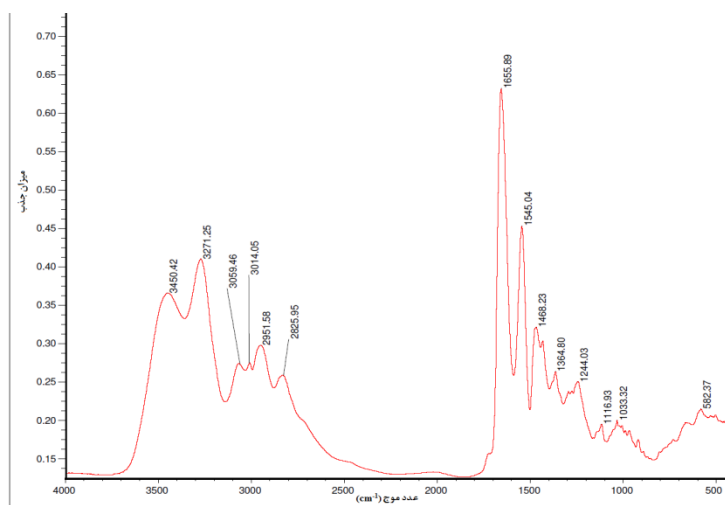
ماده ضدباکتریایی مورد بررسی از دانشگاه صنعتی امیرکبیر ایران خریداری شد. ویژگی‌های شیمیایی و ساختار آن به ترتیب در جدول ۱ و شکل ۱ آمده است [۱۵]. از دستگاه طیف سنج تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR- Fourier Transform Infrared Spectroscopy) برای نشان دادن مشخصات NPAMAM-G5 استفاده گردید (شکل ۲) (مدل Tensor، شرکت بروکر آلمان). از آب دوبار تقطیر به عنوان حلال این ماده استفاده گردید.

جدول ۱. ویژگی‌های شیمیایی نانو دندریمر پلی آمیدوآمین-G5

فرمول مولکولی	نسل نانو دندریمر	وزن مولکولی (گرم بر مول)	اندازه (نانومتر)	تعداد گروه‌های انتهایی آمینی	تعداد گروه‌های آمین داخلی
$C_{1262}H_{2528}N_{506}O_{252}$	۵	۲۸۸۲۶	۵/۳	۱۲۸	۱۲۶



شکل ۱. ساختار شیمیایی نانو دندریمر پلی آمیدوآمین-G5



شکل ۲. طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) نانو دندریمر پلی آمیدوآمین-G5

جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌های باکتریایی

این مطالعه به صورت تجربی و در مقیاس آزمایشگاهی انجام شد. باکتری‌های مورد استفاده در این مطالعه شامل باکتری‌های گرم منفی اشرشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس، سالمونلا تیفی و باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس بودند. در این پژوهش نمونه‌های محیطی از سطوح کم‌تماس و پرتماس بیمارستانی از جمله صندلی، میز کنار تخت، کف اتاق، تشک پلاستیکی و لبه کنار پنجره‌های اتاق

بیماران بستری شده در بخش‌های مختلف بیمارستان مانند بخش اطفال، جراحی، عفونی، CCU، ICU با رعایت اصول بهداشتی جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بعد از جدا شدن از محیط بیمارستان در محیط‌های کشت مایع نوترینت براث و نوترینت آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور گرمخانه‌گذاری و کشت داده شده‌اند و سپس برای تعیین گرم مثبت و گرم منفی بودن باکتری‌ها از رنگ‌آمیزی گرم استفاده شد. برای شناسایی گونه باکتری‌ها از محیط کشت

در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس دیسک‌ها در داخل پلیت‌ها به فاصله مناسب قرار گرفته و پس از گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد به وسیله خط‌کش برای هر کدام از آنها اندازه‌گیری و برحسب میلی‌متر گزارش شد.

آزمایش‌های حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) از روش رقت لوله‌ای استفاده شد. در این روش از هفت لوله برای غلظت‌های مختلف نانو دندریمر PAMAM-G5 و یک لوله شاهد برای کنترل مثبت و یک لوله شاهد برای کنترل منفی استفاده شد. شاهد مثبت شامل محیط کشت و باکتری که ماده ضد باکتریایی به آن اضافه نشده است. همچنین شاهد منفی شامل محیط کشت حاوی ماده ضدباکتریایی بدون باکتری بود. به دلیل تعیین مقدار دقیق MIC و MBC هر باکتری، ادامه آزمایش‌ها با غلظت‌های مختلف (۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) NPAMAM-G5 انجام داده شد. به لوله‌های آزمایش ۹ میلی‌لیتر از محیط کشت نوترینت برآ، ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف نانو دندریمر PAMAM-G5 و ۰/۵ میلی‌لیتر از رقت باکتریایی معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه شد. سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور گرمخانه‌گذاری شدند. پس از طی زمان انکوباسیون، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی شدند. لوله‌ای با کمترین غلظت از نانو دندریمر که رشد باکتری در آن مشاهده نشد، به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی انتخاب شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی نانو دندریمر، از لوله‌هایی که رشد در آنها مشاهده نشده بود بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از گرمخانه‌گذاری پلیت مربوط به لوله‌ای که حاوی کمترین غلظت از نانو دندریمر در آن بود و رشد باکتری در آن مشاهده نشد، به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد. تمامی آزمایش‌ها برابر با دستورالعمل‌های مؤسسه استاندارد و آزمایشگاه پزشکی (Clinical Laboratory and Standard Institute-CLSI) انجام شد [۲۳]. از نرم‌افزار SPSS برای سنجش آماری داده‌ها و از نرم‌افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده شد. برای تعیین اختلاف قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت از آزمون آماری من ویتنی (Man Withney) استفاده شد.

اختصاصی آن باکتری استفاده شد. همچنین از تست بیوشیمیایی مانند: IMVIC، کاتالاز، اندول و تست حرکت برای تعیین گونه باکتری‌ها استفاده شد. باکتری‌ها بعد از جداسازی و شناسایی، به‌منظور افزایش تعداد کلنی‌ها دوباره در شرایط هوازای و در محیط نوترینت برآث برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. تمامی محیط کشت‌های مصرفی، ساخت شرکت مرک آلمان بود.

تهیه رقت باکتریایی مطابق با استاندارد نیم مک فارلند

در میکروبیولوژی استاندارد مک فارلند به‌عنوان مرجعی برای مطابقت دادن کدورت ناشی از سوسپانسیون باکتری استفاده می‌شود، به‌طوری که تعداد باکتری‌ها در محدوده معینی خواهند بود [۲۲]. مواد مورد استفاده برای تهیه استاندارد نیم مک فارلند شامل: باریم کلرید (BaCl₂H₂O) دهیدراته و اسیدسولفوریک (H₂SO₄) بوده که از شرکت مرک تهیه شدند. با مخلوط کردن ۰/۰۵ ml باریم کلرید دهیدراته (BaCl₂H₂O) با ۱/۱۷۵ ml ۹/۹۵ اسیدسولفوریک (H₂SO₄) ۱ درصد، استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد. با مخلوط این دو ترکیب رسوب سولفات باریم که سبب ایجاد کدورت در محلول می‌شود، به‌وجود آمد. از آنجایی که تعداد باکتری تلقیح شده یکی از مهمترین متغیرهایی است که بر نتیجه این پژوهش اثر می‌گذارد، تراکم سوسپانسیون میکروبی تلقیحی باید استاندارد باشد. بدین‌منظور برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، از کشت تازه و جوان باکتری با استفاده از سوآپ استریل چندکلنی به لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل منتقل شده و پس از هم‌زدن محلول، کدورت حاصله در مقابل چراغ مطالعه با کدورت محلول نیم مک فارلند که توسط ورتکس هم زده می‌شود، مقایسه شد. این عملیات برای هر باکتری مورد مطالعه به‌طور جداگانه انجام شد.

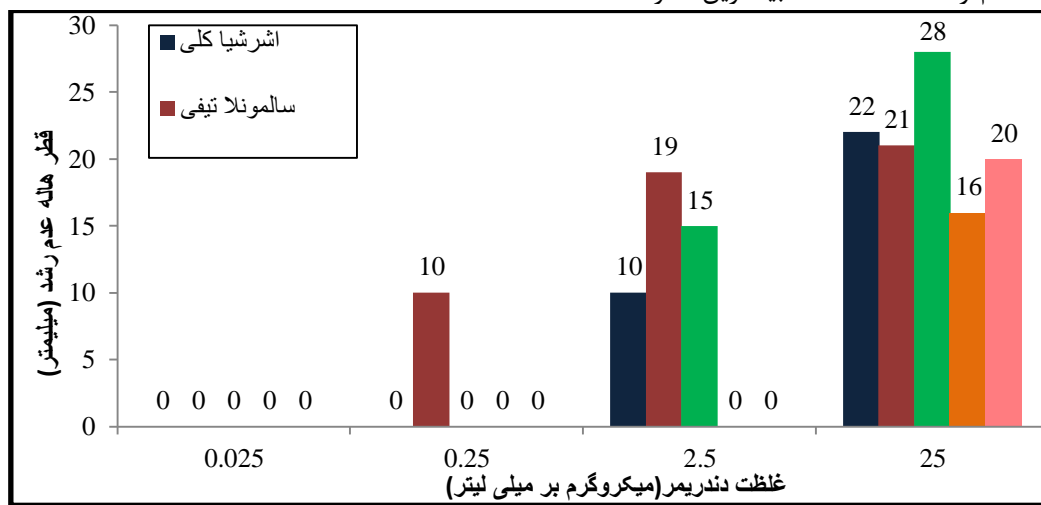
آزمایش‌های تعیین قطر هاله عدم رشد

از کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده مطابق با استاندارد نیم مک فارلند در پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار به‌وسیله سوآپ استریل به‌صورت یکنواخت کشت داده شدند. از نانو دندریمر مادر غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر با استفاده از آب مقطر استریل‌شده به روش رقیق‌سازی سریالی تهیه شدند. سپس دیسک‌های خالی (Blank disk) ۶ میلی‌متری در شرایط کاملاً استریل به ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف نانو دندریمر PAMAM-G5 آغشته و به‌منظور خشک‌شدن به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور

یافته‌ها

عدم رشد برای باکتری پروتئوس میرابیلیس در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو دندریمر برابر ۳۳ میلی‌متر به دست آمد. غلظت ۰/۰۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دندریمر هیچ تأثیری بر روی باکتری‌های مورد مطالعه نداشت و غلظت ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو دندریمر فقط بر روی باکتری سالمونلاتیفی اثرگذار بود و در این غلظت قطر هاله عدم رشد ۱۰ میلی‌متر بدست آمد. غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو دندریمر بر روی همه باکتری‌های مورد مطالعه اثرگذار بود و افزایش قطر هاله عدم رشد نسبت به غلظت‌های پایین‌تر نانو دندریمر، چشمگیر بود.

نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف نانو دندریمر NPAMAM-G5 به روش دیسک دیفیوژن در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد نانو دندریمر NPAMAM-G5 از رشد باکتری‌های گرم منفی اشرشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس، سالمونلا تیفی و باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس جلوگیری کرده و از نظر قطر هاله عدم‌رشد بین باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت تفاوت معناداری وجود نداشت ($p=0/2$). این اثر بازدارندگی بر روی باکتری‌ها با افزایش غلظت نانو دندریمر، افزایش یافت که به صورت قطر هاله عدم رشد مشاهده شد. بیشترین قطر هاله



شکل ۳. قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف نانو دندریمر NPAMAM-G

پروتئوس میرابیلیس، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس برابر ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. باکتری سالمونلاتیفی به ترتیب با ۲/۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، کمترین مقدار حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی را به خود اختصاص داده است، به عبارتی حساسیت بالا و مقاومت کمتری در برابر نانو دندریمر دارد.

حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی نانو دندریمر برای هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه بدست آورده شد. همان‌طور که جدول ۲ نشان می‌دهد حداقل غلظت بازدارندگی برای باکتری‌های پروتئوس میرابیلیس و سالمونلا تیفی برابر با ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری‌های اشرشیاکلی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس برابر با ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. حداقل غلظت کشندگی نانو دندریمر برای باکتری سالمونلاتیفی برابر با ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری‌های اشرشیاکلی،

برای باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت NPAMAM-G5 جدول ۲. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی نانو دندریمر

تأثیر بر رشد باکتری‌ها					غلظت نانو دندریمر NPAMAM-G5 (µg/l)
اشرشیا کلی	پروتئوس میرابیلیس	سالمونلا تیفی	باسیلوس سوبتیلیس	استافیلوکوکوس اورئوس	
رشد	رشد	رشد	رشد	رشد	۰/۰۲۵
رشد	رشد	رشد	رشد	رشد	۰/۲۵
رشد	MIC	MIC	MIC	رشد	۲/۵
MIC	MIC	B.S	B.S	MIC	۲۵
B.S	B.S	MBC	B.S	B.S	۵۰
MBC	MBC	B.C	MBC	MBC	۱۰۰
B.C	B.C	B.C	C.B	C.B	۲۰۰
عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	شاهد(کنترل منفی)
رشد	رشد	رشد	رشد	رشد	شاهد(کنترل مثبت)

B.S: Bacteriostatic
B.C: Bactericidal

میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو دندریمر پلی‌آمید و آمین- G4 هیچ‌گونه تأثیری بر روی کلبسیلا اوکسی‌توکا، پروتئوس میرابیلیس و سودوموناس آئروژینوز ندارد [۱۶]. در مطالعه‌ای که توسط راویکومار و همکارانش در مورد تأثیر ضدباکتریایی نانو ذرات CeO_2 و ZrO_2 ، Al_2O_3 ، MgO ، Fe_3O_4 بر روی باکتری کلبسیلا انجام شده بود، یافتند که قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب برابر ۸، ۶، ۶، ۹ و ۸ میلی‌متر است [۲۵].

عامل اصلی تأثیر ضدباکتریایی بالاتر NPAMAM-G5 در مقایسه با نسل‌های پایین‌تر، بیشتر بودن تعداد گروه‌های انتهایی آمینی می‌باشد. در دندریمر نسل چهارم تعداد گروه‌های انتهایی آمینی ۶۴ عدد می‌باشد در حالی که این تعداد در نانو دندریمر NPAMAM-G5 برابر ۱۲۸ عدد می‌باشد [۲۰].

با توجه به اینکه گروه‌های آمینی دارای بار مثبت و باکتری‌های نیز دارای بار منفی می‌باشند به همین دلیل از طریق نیروی الکترواستاتیک جذب باکتری‌ها شده و از طریق دیواره سلولی نفوذ می‌کنند. در نهایت به غشاء سیتوپلاسمی متصل شده و آن را متلاشی می‌کند. با متلاشی شدن غشای سیتوپلاسمی یون‌هایی از قبیل پتاسیم و فسفات و مواد هسته-ای از قبیل DNA و RNA از سلول آزاد می‌شوند (۱۹).

باکتری‌های مورد بررسی در مطالعه NPAMAM-G4 از محیط آبی جدا سازی شده بودند در حالی که در مطالعه حاضر باکتری‌ها از محیط بیمارستانی جدا سازی شده‌اند. در مطالعات متعددی ثابت شده است باکتری‌ها در محیط‌های بیمارستانی به اغلب ضد باکتری‌ها مقاوم می‌شوند [۱۲ و ۲۶]. در این

بحث

عفونت‌های بیمارستانی به دلیل مرگ‌ومیر و هزینه اقتصادی، یکی از مهم‌ترین چالش‌هایی است که بخش مراقبت هر بیمارستان با آن مواجه است [۲۴] و بیشترین درصد عفونت‌های بیمارستانی توسط باکتری‌ها ایجاد می‌شود [۲]. در این مطالعه از نانوذرات NPAMAM-G5 برای ارزیابی تأثیر آن بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی استفاده شد. این مطالعه نشان داد نانو دندریمر NPAMAM-G5 خاصیت ضد باکتریایی بسیار مناسبی در حذف باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت دارد. شکل ۳ نشان می‌دهد با افزایش غلظت نانو دندریمر از ۰/۰۲۵ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر قطر هاله عدم‌رشد برای تمامی باکتری‌ها به‌طور چشمگیر افزایش یافته است.

در مطالعه‌ای که توسط ایزانلو و همکارانش در مورد اثر ضدباکتریایی نانو دندریمر پلی‌آمید و آمین-G4 و پلی‌پروپیلین ایمن نسل دوم به روش دیسک دیفیوژن انجام داده بودند، یافتند که هاله عدم رشد در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانو دندریمر پلی‌آمید و آمین-G4 برای کلبسیلا اوکسی‌توکا، پروتئوس میرابیلیس و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب برابر ۲۰، ۱۸ و صفر میلی‌متر است و در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانو دندریمر پلی‌پروپیلین ایمن نسل دوم هاله عدم رشد برای کلبسیلا اوکسی‌توکا، پروتئوس میرابیلیس و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب برابر ۲۵، ۱۵ و ۲۰ میلی‌متر بود. همچنین این مطالعه آشکار کرد غلظت‌های ۰/۵، ۵ و ۵۰

مقدار ماده سازنده غشاء پتیدوگلیکان آنها است [۳۱]. بنابراین انتظار می‌رود، مقاومت بیشتری در مقابل عوامل ضد میکروبی از خود نشان دهند. با این حال، در برخی مطالعات نتایجی عکس نتایج فوق گزارش شده است. در مطالعه‌ای خاصیت ضدباکتریایی نانو دندریمرهای پتیدی با وزن مولکولی پایین، علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی بررسی شده بود. نتایج مطالعه نشان داد در اکثر نانو دندریمرهای پتیدی مورد بررسی، تأثیر نانو دندریمر بر باکتری اشرشیاکلی ضعیف‌تر از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بوده است [۳۲].

در بررسی که در مورد اثر ضد باکتریایی نانوذرات دی‌اکسید سیلیکون، اکسید روی و دی‌اکسید تیتانیوم انجام شده بود، نشان دادند که باکتری اشرشیاکلی نسبت به باسیلوس سوبتیلیس از مقاومت بالاتری برخوردار است [۳۳]. احتمالاً نقطه هدف ماده ضدباکتریایی با مقیاس نانو فقط دیواره سلولی (گرم مثبت یا گرم منفی) نیست. براساس نتایج این مطالعه نانو نانو دندریمر NPAMAM-G5 برای حذف باکتری‌های گرم منفی اشرشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس، سالمونلاتیفی و باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس بسیار مؤثر است. در ادامه این تحقیق پیشنهاد می‌شود، با توجه به اینکه نانو نانو دندریمرهای پلی‌امید و آمین هیچ‌گونه سمیت بر سلول‌های انسانی و حیوانی ندارد [۲۱]، از این ماده می‌توان به‌عنوان ماده ضدباکتریایی در ضدعفونی تجهیزات و سطوح بیمارستانی استفاده کرد. با این حال استفاده از نانودندریمر برای ضدعفونی تجهیزات و سطوح بیمارستانی نیازمند مطالعات بیشتر و وسیع‌تر است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی اردبیل در سال ۱۳۹۴ با شماره مصوب ۴۹۳۵ است که بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری و کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل در تأمین هزینه‌های آن تشکر و قدرانی می‌شود. همچنین از آقای آرغانی کارشناس آزمایشگاه میکروپزشناسی پزشکی برای همکاری در انجام این پروژه، بسیار سپاسگزاریم.

مطالعه نانو دندریمر NPAMAM-G5 نشان داد حتی در غلظت‌های خیلی پایین‌تر نیز اثر ضدباکتریایی بالایی دارد. مقدار حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر از باکتری‌های گرم منفی پروتئوس میرابیلیس و سالمونلاتیفی بود. علاوه بر این باکتری‌های گرم مثبت قطر هاله عدم رشد کمتری در همه غلظت‌های نانو دندریمر نسبت به باکتری‌های گرم منفی اشرشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس و سالمونلاتیفی داشتند. حتی در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۲۵ و ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو دندریمر قطر هاله عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت برابر صفر بود. در مطالعه که توسط جعفری و همکارانش در مورد خواص ضد میکروبی نانو ذرات نقره و اکسید روی در حالت منفرد و ترکیب با یکدیگر انجام شده بود یافتند که سویه‌های گرم منفی نسبت به سویه‌های گرم مثبت در مقابل ترکیب دو نانو ذره حساسیت بیشتری دارند [۲۷]. در مطالعه‌ای که در مورد نحوه اثرگذاری نانو ذرات بر روی باکتری‌های انجام شده بود به این نتیجه رسیدند، میزان تجمع بار منفی بر روی سطح سلولی باکتری‌های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت است. بر هم کنش بین نانو ذرات دارای بار مثبت و دیواره سلولی دارای بار منفی منجر به نشد محتویات درون سلول باکتری می‌شود [۲۸]. در بررسی که اثر نانوذرات اکسید روی بر رشد باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس و اشرشیاکلی O157:H7 انجام شده بود به این نتیجه رسیدند که باکتری گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس مقاومت بیشتری نسبت به باکتری گرم منفی اشرشیاکلی O157:H7 دارد [۲۹]. در یکی از بررسی‌های انجام شده درباره آثار ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی به این نتیجه رسیدند که مقاومت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر از اشرشیاکلی است و حداقل غلظت کشندگی به ترتیب برای اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس برابر ۱۲۵۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود [۳۰]. حساسیت کمتر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی به دلیل وجود لایه پتیدوگلیکان ضخیم در باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. تفاوت اصلی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در دیواره سلولی و

پی‌نوشت‌ها:

1. Coronary care unit
2. Intensive care unit

References

1. Toulabi T, Janani F, Qurbanmohammadi E. The Appropriateness of Educational Programs' Objectives for Professional Needs: The Viewpoints of Khorramabad School of Nursing and Midwifery Graduates. *Iran J Med Educ*. 2009; 8(2): 263-73. [in Persian]
2. Jain A, Singh K. Recent advances in the management of nosocomial infections. *JK Science*. 2007; 9(1): 3-8.
3. Burke JP. Infection control-a problem for patient safety. *New Engl J Med*. 2003; 348(7):651-6.
4. Zaman zad B, kherad var D. The sensitivity pattern of bacteria extracted from medical instruments of different wards of Kashani hospital to routine antibacterial agents, Shahrekord, 1996 . *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2002; 3 (4) :25-30. [in Persian]
5. Zobeiri M, Karami Matin B. Determining of Microbial Contamination and its Related Factors in Hands of ICU Staff in the Hospitals of Kermanshah (2002). *J Kermanshah Univ Med Sci*. 2005; 9(2): 52-7. [in Persian]
6. Hoseinzadeh E, Samarghandi MR, Alikhani MY, Asgari Gh, Roshanaei Gh. Effect of Zink Oxide (ZnO) nanopartiecles on death kinetic of gram-negative and positive bacterium. *J Babol Univ Med Sci*. 2012; 14(5): 13-9. [in Persian]
7. Madani SH, Khazae S, Kanani M, Shahi M. Antibiotic resistance pattern of E. coli isolated from urine culture in Imam Reza Hospital Kermanshah-2006. *J Kermanshah Univ Med Sci*. 2008; 12(3): 287- 95. [in Persian]
8. Eskandarlou a, Yousefi MR. The Evaluation of Bacterial Contamination of Active Radiography Apparatus in Dental Centers of Hamadan City. *J Hamadan Univ Med Sci*. 2006; 12(4): 55-9. [in Persian]
9. Roshaliza H, Liu C, Joanna O. Can the use of 70% isopropyl alcohol swab or aspiration using 5 microm Filter Straw reduce bacterial contamination of fentanyl solution used for regional anaesthesia? *The Medical journal of Malaysia*. 2011; 66(2): 92-4.
10. Jokar A, Mohebi Z, Garmaznejad S, Sharifi M. A Comparison of Efficacy of Isopropyl Alcohol and Ethanol in Disinfection Programs in Pediatrics Ward and Neonatal Intensive Care Unit. *Hayat*. 2009; 15(3): 52-8. [in Persian]
11. Nazari S, Yari AR, Mahmodian MH, Tanhaye Reshvanloo M, Alizad Matboo S, Majidi G and et al. Application of H₂O₂ and H₂O₂/Fe⁰ in removal of Acid Red 18 dye from aqueheous solutions. *Archives of Hygiene Sciences* .2013; 2(3): 114-20.
12. Izanloo H, Ahmadi Jebelli M, Nazari Sh , Safavi N, Tashauoei HR, et al. Studying the antibacterial effect of Polyamidoamine-G4 Dendrimer on some of the gram-negative and gram-positive bacteria. *J Arak Univ Med Sci*. 2014; 17(90): 1-10. [in Persian]
13. Shahbazi B, Khodabandelo M, Rezaei MJ, Rouhi S, Shakib P, Ramazanzadeh R. Mutagenicity Survey and Antibacterial Activity of Various Generations of Poly (Amid Amine)(PAMAM) Dendrimers and Algonac Acid Poly (Amid Amine)(PAMAM) Dendrimer Nano Composite G2 on Some Enteric Pathogenic Bacteria. *Int J Enteric Pathog*. 2014; 2(4): 1-6.
14. Hasan Izanloo SN, Mohammad Ahmadi Jebelli, Soodabeh Alizadeh Matboo,, Hamid Reza Tashauoei BV. Studying the Polypropylenimine-G2 (PPI-G2) Dendrimer Performance in Removal of Escherichia coli, Proteus mirabilis, Bacillus subtilis and Staphylococcus aureus from Aqueous Solution. *J Arak Univ Med Sci*. 2015; 18(99): 8-16.
15. Eichman JD, Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Baker JR. The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells. *Pharm Sci Technol To*. 2000; 3(7): 232-45.
16. Izanloo H, Tashauoei HR, Khazae M, Nazari Sh, Mjidi Gh, Vaziri Rad V and et al. The antimicrobial effects of Polypropylenimine-G2 and Polyamidoamine-G4 Dendrimers on Klebsiella oxytoca, Pseudomonas aeruginosa and Proteus mirabilis, in vitro experiment. *J Sabzevar Univ Med Sci*. 2014; 21(5): 925-33.
17. Strydom SJ, Rose WE, Otto DP, Liebenberg W, de Villiers MM. Poly (amidoamine) dendrimer-mediated synthesis and stabilization of silver sulfonamide nanoparticles with increased antibacterial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2013; 9(1): 85-93.
18. Hou S, Zhou C, Liu Z, Young AW, Shi Z, Ren D, et al. Antimicrobial dendrimer active against Escherichia coli biofilms. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2009; 19(18): 5478-81.
19. Chen CZ, Cooper SL. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. *Biomaterials*. 2002; 23(16): 3359-68.
20. Hermanson GT. *Bioconjugate techniques*: 3rd ed: Elsevier; 2013. p. 351-86.

21. Felczak A, Wrońska N, Janaszewska A, Klajnert B, Bryszewska M, Appelhans D, et al. Antimicrobial activity of poly (propylene imine) dendrimers. *New J Chem*. 2012; 36(11): 2215-22.
22. Zapata A, Ramirez-Arcos S. A Comparative Study of McFarland Turbidity Standards and the Densimat Photometer to Determine Bacterial Cell Density. *Curr Microbiol*. 2015; 70(6): 907-9.
23. Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) performance standards for antimicrobial disk diffusion susceptibility tests: 19th ed: approved standard. CLSI document M.100-S19; 2009: 29.
24. Duque ÂS, Ferreira AF, Cezário RC, Gontijo Filho PP. Nosocomial infections in two hospitals in Uberlandia, Brazil. *Rev panam infectol*. 2007; 9(4): 14-8.
25. Ravikumar S, Gokulakrishnan R. The inhibitory effect of metal oxide nanoparticles against poultry pathogens. *Int J Pharm Sci Drug Res*. 2012; 4: 157-9.
26. Savas L, Guvel S, Onlen Y, Savas N, Duran N. Nosocomial urinary tract infections: microorganisms, antibiotic sensitivities and risk factors. *West Indian Med J*. 2006; 55(3): 188-93.
27. Jafari A, Ghane M, Arastoo S. Synergistic antibacterial effects of nano zinc oxide combined with silver nanocrystales. *African Journal of Microbiology Research*. 2011;5(30):5465-73.
28. Chung Y-C, Su Y-P, Chen C-C, Jia G, Wang H-I, Wu JG, et al. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2004; 25: 932-6.
29. Esmailzadeh H, Sangpour P, Khaksar R, Shahraz F. The Effect of ZnO Nanoparticles on the Growth of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* O157:H7. *Food Technology & Nutrition* 2014; 11(3): 21-8. [in Persian]
30. Hoseinzadeh E, Alikhani MY, Samarghandi MR, Shirzad Siboni M. Antimicrobial potential of synthesized zinc oxide nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. *Desalination and Water Treatment*. 2014; 52(25-27): 4969-76.
31. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Medical microbiology*: 25th ed: United States; 1998: 73.
32. Janiszewska J, Swieton J, Lipkowski AW, Urbanczyk-Lipkowska Z. Low molecular mass peptide dendrimers that express antimicrobial properties. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003; 13(21): 3711-3.
33. Adams LK, Lyon DY, Alvarez PJ. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Res*. 2006; 40(19): 3527-32.

Assessment of antibacterial effect of nano polyamidoamine-G5 (NPAMAM-G5) dendrimer on escherichia coli, proteus mirabilis, salmonella typhi, bacillus subtilis and staphylococcus aureus isolated from the hospital environment

Shahram Nazari¹, Sosan Bagheri², Lila Mohammadi², Gharib Majidi¹, Aziz Kamran³, Esrafil Asghari⁴, Payman Azghani⁵, Zohreh Darkhosh⁶, Zohreh Nazari⁷, Soudabeh Alizadeh Matboo⁸

1. M.Sc., School of Public Health, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran
2. Expertis, Khalkhal Faculty of Medical Sciences; Member of Student Research Committee, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
3. Assistant Professor, Khalkhal Faculty of Medical Sciences; Member of Student Research Committee, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
4. M.Sc. in Environmental Health Engineering, School of Khoy Health, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
5. M.Sc in Bacteriology, School of Medical, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
6. B.Sc. in Nursing, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran
7. B.Sc. in Nursing, Islamic Azad University, Ardabil University of Medical Sciences, Ardebil, Iran
8. B.Sc. in Environmental Health Engineering, School of Public Health and Student Research Committee, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

Abstract

Background & Objectives: This study aimed to examine the antibacterial effect of Nano Polyamidoamine-G5 (NPAMAM-G5) dendrimer on *Escherichia Coli*, *Proteus Mirabilis*, *Salmonella Typhi*, *Bacillus Subtilis* and *Staphylococcus Aureus* isolated from the hospital environment.

Materials & Methods: In this study, the antibacterial effects of NPAMAM-G5 dendrimer were studied by disc diffusion and micro-dilution method. Different concentrations of Polyamidoamine-G5 inoculated onto blank disks and were placed in Mueller-Hinton agar media. Zone of inhibition was investigated by bacterial inoculation according to the McFarland standard 0.5. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of NPAMAM-G5 dendrimer were determined by micro-dilution method.

Results: Zone of inhibition in Polyamidoamine-G5 dendrimers concentration of 25 µg/mL for *Escherichia Coli*, *Proteus Mirabilis*, *Salmonella Typhi*, *Bacillus Subtilis* and *Staphylococcus Aureus* were 22, 28, 21, 16 and 20 mm, respectively. Regarding the zone of inhibition in gram negative bacteria with gram positive ones was $p=0.16$ and was not significant different. The minimum inhibitory concentration for both *Proteus Mirabilis* and *Salmonella Typhi* was 2.5 µg/mL and for *Escherichia Coli*, *Bacillus Subtilis* and *Staphylococcus Aureus* was 25 µg/mL. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for *Salmonella Typhi* was 50 µg/mL and for all *Proteus Mirabilis*, *Escherichia Coli*, *Bacillus Subtilis* and *Staphylococcus Aureus* was 100 µg/mL.

Conclusion: According to the results, NPAMAM-G5 dendrimer can effectively eliminate *Escherichia Coli*, *Proteus Mirabilis*, *Salmonella Typhi*, *Bacillus Subtilis* and *Staphylococcus Aureus*.

Received: 2016/04/22

Accepted: 2016/08/16

Keywords:

antibacterial effect, gram negative and gram positive bacteria, hospital environment, nano polyamidoamine-G5.