

Synergistic Effect of Silver Nanoparticles and Probiotic *Lactobacillus Plantarum* on the Expression of MexA Component Gene of Pump Efflux System in Drug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates

Fadhl Rajeh Swade ¹, Farahnaz Molavi ^{2*}, Samaneh Dolat-Abadi ³

1. M.Sc. Student in Cellular and Molecular Sciences, Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran
3. Assistant Professor, Department of Biology, Nysaboor Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
4. Corresponding Author: Farahnaz Molavi, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Received: 2021/07/24

Accepted: 2021/09/15

Abstract

Introduction: At present, *Pseudomonas aeruginosa* bacteria has caused many problems to control nosocomial infections due to its resistance to various antibiotics and MexAB-OprM efflux pumps play an important role in making *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to antibiotics. The aim of this study was to determine the antimicrobial effect of silver nanoparticles and probiotic *Lactobacillus plantarum* on MexA gene expression.

Materials and Methods: In this descriptive cross-sectional study, 49 strains were collected from 8 medical diagnostic laboratories in Mashhad during the years 1398-1399 for 8 months. Evaluation of antibiotic susceptibility pattern of strains was using disk diffusion method based on CLSI protocol. After treatment of multidrug resistant bacteria with inhibitors, microdilution method and Real time-PCR technique were used to determine the effective dilution of silver nanoparticles and probiotics on the expression of MexA gene of its producing bacterium, respectively.

Results: All samples were identified and all of them were resistant to more than two antibiotics and had MexA gene. The minimum growth inhibition concentration in agar dilution method was up to 250 µg / ml for silver nanoparticles and up to 18 µg / ml for probiotics. Silver nanoparticles had a greater effect in inhibiting bacterial growth compared to probiotics and this effect is less than the combined effect of probiotics and silver nanoparticles ($P > 0.05$).

Conclusion: Silver and probiotic nanoparticles have inhibitory and antibacterial activity to reduce the performance of MexAB-OprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. ($P > 0.05$).

***Corresponding Author:** Farahnaz Molavi

Address: Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Tel: 09155116504

E-mail: fm_yazdan@yahoo.com

Keywords: Iran, MexAB-OprM, Multidrug resistance, Nanoparticles, *Pseudomonas*,

How to cite this article: Rajeh Swade F., Molavi F., Dolat-Abadi S. Synergistic Effect of Silver Nanoparticles and Probiotic *Lactobacillus Plantarum* on the Expression of MexA Component Gene of Pump Efflux System in Drug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2022; 29(3):421-434.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a gram-negative bacterium that, as an important pathogen, causes widespread infections in various parts of the human body. *Pseudomonas aeruginosa* is. At present, identifying the mechanisms of resistance of this bacterium is a priority of expert research. According to reports from the last decade, an important part of the bacterial resistance of this bacterium is related to efflux pump systems. *Pseudomonas aeruginosa* has the potential to express 12 types of multidrug efflux pumps called Mex. Among pump efflux pumps, MexAB-OprM is the first known efflux pump to play a major role in the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains. A nanoparticle or ultrafine particle is usually defined as a particle of matter that is between 1 and 100 nanometres (nm) in diameter. Nanoparticles occur in a great variety of shapes, which have been given many informal names such as nanospheres, nanorods, nanochains, nanostars, nanoflowers, nanoreefs, nanowhiskers, nanofibers, and nanoboxes. Because of their small size, nanoparticles can easily cross the membrane and due to their combination with various components in the cell, they cause widespread dysfunction of bacteria, which can be used to kill bacteria. The first discovered probiotic was a certain strain of bacillus in Bulgarian yogurt, called *Lactobacillus bulgaricus*. The discovery was made in 1905 by Bulgarian physician and microbiologist Stamen Grigorov. The modern-day theory is generally attributed to Nobel laureate Élie Metchnikoff, who postulated that yoghurt-consuming Bulgarian peasants lived longer. Probiotics have received renewed attention in the 21st century from product manufacturers, research studies, and consumers. Their history can be traced to the first use of cheese and fermented products that were well known to the Greeks and Romans who recommended their consumption. The fermentation of dairy foods represents one of the oldest techniques for food preservation. Probiotics are beneficial microorganisms. Which have the ability to inhibit pathogenic microbes and affect the expression of their virulence genes. Among different types of probiotics, different strains of *Lactobacillus* are more effective and can prevent the expression of viruses causing microbial virulence alone or in combination with different antibacterial agents. Today, probiotics derived from *Lactobacillus*, due to their antimicrobial properties such as aggregation, prevent the attachment and establishment of pathogenic bacteria to the host

body and are used as a new way to control diseases such as cancers. The aim of this study was to determine the antimicrobial effect of silver nanoparticles and probiotic *Lactobacillus plantarum* on gene expression of an important component of this pump efflux system called MexA in samples of *Pseudomonas aeruginosa* with multidrug resistance.

Methodology

In this descriptive cross-sectional study performed over a period of 9 months, 49 bacterial strains of *Pseudomonas aeruginosa* were collected from 11 medical diagnostic laboratories in Mashhad. First, all collected strains were cultured in Müller-Hinton agar medium and incubated for 24 hours at 37 ° C. Then, for identification of *Pseudomonas aeruginosa*, collected from diagnostic tests of hot staining, growth in McConkey agar medium, SIM, MB, oxidase test, catalase, urease, reaction in TSI medium, OF test, mobility study, growth in streamide agar medium (Simon citrate agar) and growth was used at 42 ° C Hinton agar (8). The identified strains were placed in LB Broth commercial culture medium containing 20% glycerol at -70 ° C. The standard sample of bacteria used in this study was ATCC27853 *Pseudomonas aeruginosa*, which was purchased for lyophilization. It is worth mentioning that the present study was conducted in accordance with the protocol of the Medical Ethics Committee of the Islamic Azad University, Mashhad Branch, with the ethics code IR.IAU.MSHD.REC.1400.025. *Pseudomonas aeruginosa* colonies dissolved in nutrient broth medium were measured to the half McFarland standard for antibiogram testing, and when the desired turbidity was reached, the strains were cultured on Müller-Hinton agar medium. Then, the antibiotic discs purchased from Padten Teb Company were quality controlled by disk diffusion method by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and after confirming the diameter of the obtained halos according to CLSI 2018 standard, these discs were used for the studied strains. The diameter of the growth inhibition zone was measured and the antibiotic susceptibility of the bacteria was obtained according to the CLSI 2018 method. In this study, strains with multidrug resistance were identified and used to continue the work. DNA extraction and study of MexA gene of efflux pump using PCR technique: Before treating the multidrug resistant strains with nanoparticles and probiotics to confirm the presence

of MexA gene, DNA was extracted and then PCR technique was used to confirm the presence of the desired gene. DNA extraction was performed with a DNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) and according to the manufacturer's work method. After designing, the primers were ordered from Sinaclon Iran for synthesis (Table 1). PCR reaction with final volume of 25 μ l including 12 μ l (Iran, Sinaclone) PCR master mix 5X with U / μ l 5 Taq DNA polymerase, Mm5 / 2.5 MgCl₂, 2.5 mM of dNTPs, 1 μ l of each primer, 5 μ L From DNA template and 6 μ l of sterile double distillation water using a thermocycler gradient (Eppendorf, Germany) with a temperature program, an initial denaturation cycle consisting of: 94 ° C for 15 minutes, and spinning at 94 ° C for 30 seconds, primer binding At 52 ° C for 30 s, elongation at 72 ° C for 30 s and a final expansion at 72 ° C for 10 min. Electrophoresis of the PCR product was performed on 1% agarose gel along with DNA Ladder 100bp in TBE buffer for 60 minutes at 100 voltage . For gel staining, it was placed in an ethidium bromide tank for 15 minutes and the results were observed by a Geldocument with UV light. In general, PCR reactions used water as a negative control and bacteria with MexA gene as a positive control. Silver nanoparticle powder (ARMINANO brand) was purchased from Armina Ebtekar Sustainable Engineering Company and to prepare a series of dilution of nanoparticles by serial dilution method of silver nanoparticles, 31, 25/62, 250,125, 500, 1000 dilution series were prepared. Lactobacillus plantarum probiotic strain was purchased from Iran Scientific-Industrial Research Center. Determination of minimum growth inhibitory concentration for silver and probiotic nanoparticles:First, the bacterial suspension was prepared by comparing the half McFarland standard. The turbidity density was confirmed by measuring the absorbance in the spectrophotometer at 625 nm between 8% and 0.1%. Microdilution broth method was used to measure the effect of different concentrations of silver nanoparticles and probiotics on the expression of the MexA gene of the efflux pump in bacteria. , Was used. Then 100 μ l of silver nanoparticles and probiotic were added separately to the TSB medium with specified dilutions and serial dilution was performed. Finally, 100 μ l of standard microbial suspension was added to all wells. Also, the first row of positive control (environment and microbial suspension) and the second row of negative control (environment and treatment material) were considered. The microplates were

incubated in a shaker incubator for 24 hours at 37 ° C at 200 rpm. RNA extraction was performed using Total RNA Extraction mini Kit (Yekta Tajhiz Azma, Iran) and after treatment with silver nanoparticles, probiotics and silver nanoparticles with probiotics (dilution after MIC). After RNA extraction, to ensure the accuracy of the extraction and the sample, a nanodrop, 260/260 and 280/260 nm optical absorption methods were quantitatively evaluated. The extracted RNA was stored at -20 ° C until use. For cDNA synthesis, cDNA Synthesis Kit (Yekta Tajhiz Azma, Tehran) was used. In this method, after incubating the extracted RNA for 5 minutes at 70 ° C, the reverse transcription process was performed. This process was performed with 2 μ l Random Primer, 0.8 μ l AMV Reverse Transcriptase, 2 μ l 10mM Dntp, 1 μ l RNasin® Ribonuclease Inhibitor and 2 μ l AMV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer at 42 ° C for 60 minutes. It was then placed in a thermocycler for 10 minutes at 70 ° C (to inactivate the RT enzyme). The reaction in the 20 μ l volume of the South Korean Genet Kit was performed as follows: 10 μ l of Prime Qmaster mix (2x) with syber green, 5 μ l of Depc water, 1 μ l of each primer (14), 1 μ l of Rox dye and two Microliters of cDNA were used. The desired fragment was propagated according to Table 2 in 35 cycles. The 16s rRNA home gene was used as internal control. Data analysis was performed on the treated and control samples using data equation and drawing graphs of LightCycler Relative Quantification Software. Data related to alteration of MexA gene expression were analyzed by 2- $\Delta\Delta$ CT method with the assumption of 100% efficiency and using independent t-test in three groups.

Result

All 49 strains of *Pseudomonas aeruginosa* collected from 11 medical diagnostic laboratories in Mashhad were identified by microbiological and biochemical diagnostic and confirmatory tests. The results showed that all strains were resistant to more than two antibiotics, so all strains were used to continue. Amplification of the MexA efflux pump gene in strains with multidrug resistance showed the presence of a 530 bp band in gel electrophoresis. Strains containing the desired gene were considered as positive control. Antibiogram test shows that 49 strains wee resistant to Amoxicillin-Clonic Acid, 49 strains wee resistant to Gentamicin (GM10), 49 strains wee resistant to Clindamycin (CC2),17

strains were resistant to Imipenem (IMP10), 49 strains were resistant to Tetracycline (TE30), 49 strains were resistant to Ceftazidime (CAZ30), 11 strains were resistant to Chloramphenicol (CH30), 49 strains were resistant to Cefazolin (CZ30), 49 strains were resistant to Erythromycin (E15) and 49 strains were resistant to Sulfamethoxazole (SMX). The results of this step showed that all strains with multidrug resistance had the MexA gene. The results of MIC study or minimum growth inhibition concentration of bacterial strains showed that the best cell killing concentration for silver nanoparticles is 250 µg/ml and for probiotic 18 µg/ml. To compare the effect of silver nanoparticles and probiotic and their synergistic effect on MexA gene expression, gene expression in four cell groups including: silver nanoparticles treated, probiotic treated, silver nanoparticles treated with probiotic and untreated using melting curve analysis. Melting curve analysis and the amplification curve were examined with three replications. The result shows the amplification curve of the Real time PCR machine, samples of *Pseudomonas aeruginosa* untreated and treated with nanoparticles and probiotic and internal control gene with different colors. As can be seen in the figure, the genes that had more expression had lower Ct, where Ct had less internal control samples (16S rRNA) and entered the Exponential phase earlier in the curve, and the bacterial samples after treatment with silver nanoparticles and silver nanoparticles with probiotics have less expression in genes and more Ct. MexA gene expression in nanoparticle-treated inhibitor strains and the synergistic effect of nanoparticles and probiotic were significantly different, but silver nanoparticles had a greater effect on gene expression than probiotic treatment and the synergistic effect of probiotic nanoparticles had the greatest effect on reducing gene expression. MexA and based on the results of P-value gene expression assay, there was a

statistically significant difference in gene expression between the 3 groups.

Conclusion

Silver nanoparticles and probiotic *Lactobacillus plantarum* have inhibitory and antibacterial activity to reduce the performance of MexAB-OprM efflux pump in *P. aeruginosa*. but their synergistic use is more effective. Due to the high potential of silver nanoparticles and probiotics to inhibit the growth of *Pseudomonas aeruginosa*, these substances can be used separately to control *Pseudomonas aeruginosa* infections, but their synergistic use is more effective, especially because probiotics are beneficial compounds for the body and harm to them. They do not import it, they are used in conjunction with nanoparticles because they reduce the amount of nanoparticles in synergistic antibacterial compounds. This synergistic compound is more useful for controlling infection. In general, from this study, it can be concluded that in the future, to control infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* or any other bacterium that causes infections, we can use nanoparticles with other antimicrobials specially probiotics because they have many benefits for the human body.

Acknowledgment

The authors at this moment express their gratitude to all the individuals and organizations who assisted us in this research and made this research possible.

Conflict of Interest: The authors declare that there are no conflict of interest regarding the publication of this manuscript

بررسی اثر هم‌افزایی نانوذرات نقره و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر بیان ژن جزء MexA سیستم افلاکس پمپ در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به دارو

فضل راجح سوادى^۱، فرحناز مولوى^{۲*}، سمانه دولت‌آبادى^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد مشهد، ایران
۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد مشهد، ایران
۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نیشابور، نیشابور، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: در حال حاضر، باکتری سودوموناس آئروژینوزا به دلیل مقاوم شدن به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها مشکلات فراوانی را برای کنترل عفونت‌های بیمارستانی به‌وجود آورده است و پمپ‌های افلاکس MexAB-OprM نقش مهمی در ایجاد مقاومت سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. هدف این مطالعه، تعیین تأثیر ضد میکروبی نانوذرات نقره و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر بیان ژن MexA است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۴۹ سویه در مدت ۸ ماه، از ۱۱ آزمایشگاه تشخیص طبی مشهد طی سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۹ جمع‌آوری شدند. ارزیابی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، از روش انتشار دیسک براساس پروتکل CLSI استفاده شد. پس از تیماردهی باکتری‌های دارای مقاومت چند دارویی با مواد مهارکننده، از روش میکروداپلوشن و تکنیک Real time-PCR به‌ترتیب برای تعیین رقت اثربخش نانوذرات نقره و پروبیوتیک بر بیان ژن MexA باکتری مولد آن استفاده شد.

یافته‌ها: تمام نمونه‌ها تأیید هویت شدند و تمام آنها به بیش از دو آنتی‌بیوتیک، مقاوم و واجد ژن MexA بودند. کمترین غلظت مهار رشد در روش رقت در آگار برای نانوذرات نقره تا رقت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای پروبیوتیک تا رقت ۱۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. نانوذرات نقره در مقایسه با پروبیوتیک تأثیر بیشتری بر مهار رشد باکتری داشتند و میزان این تأثیر نسبت به اثر ترکیبی پروبیوتیک و نانوذرات نقره کمتر می‌باشد ($P>0.05$).

نتیجه‌گیری: نانوذرات نقره و پروبیوتیک، فعالیت‌های و آنتی‌باکتریال برای کاهش عملکرد پمپ افلاکس MexAB-OprM در باکتری سودوموناس آئروژینوزا دارد.

* نویسنده مسئول: فرحناز

مولوی

نشانی: گروه زیست‌شناسی،
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد
مشهد، مشهد، ایران
تلفن: ۰۹۱۵۵۱۱۶۵۰۴

رایانامه:
Farahmolavi@gmail.com

شناسه ORCID:

0000-0002-8348-2214

شناسه ORCID نویسنده اول:

0000-0002-8348-2910

کلیدواژه‌ها:

MexAB-OprM، سودوموناس،
نانوذرات، مقاومت چند دارویی،
ایران

۱. مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی است که به‌صورت یک پاتوزن مهم، عفونت‌های گسترده‌ای را در بخش‌های مختلف بدن انسان ایجاد می‌کند [۱]. سودوموناس آئروژینوزا در بیشتر موارد، یک باکتری هوازی اجباری است [۲] که نسبت به گروه‌های مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌باشد [۳]. مقاومت روزافزون این باکتری و عفونت‌های ناشی از این باکتری‌های مقاوم‌شده، سبب مرگ‌ومیر گسترده در جهان است [۴]. در حال حاضر، شناسایی

مکانیسم‌های مقاومت این باکتری، در اولویت پژوهش‌های متخصصان قرار گرفته است. طبق گزارش‌های دهه اخیر، بخش مهمی از مقاومت دارویی این باکتری مربوط به سیستم‌های پمپ افلاکس است. سودوموناس آئروژینوزا دارای پتانسیل بیان ۱۲ نوع پمپ افلاکس چند دارویی به نام Mex می‌باشد [۵]. در میان پمپ‌های افلاکس پمپ، MexAB-OprM نخستین پمپ افلاکس شناخته شده است که در مقاومت سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا نقش اصلی را دارد.

کمیتة اخلاق پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد با کد اخلاق IR.IAU.MSHD.REC.1400.025 انجام شده است.

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی (آزمون آنتی‌بیوگرام)

به‌منظور اجرای آزمون آنتی‌بیوگرام کلونی‌های سودوموناس آئروژینوزای حل‌شده در محیط نوترینت برات با استاندارد نیم‌مک فارلند سنجیده شد و وقتی به کدورت موردنظر و مطابق استاندارد رسید، سوبه‌ها بر محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی که از شرکت پادتن طب خریداری شده بود با روش دیسک دیفیوژن توسط سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 کنترل کیفی شد و پس از تأیید قطر هاله‌های به‌دست‌آمده مطابق با استاندارد CLSI 2018 از این دیسک‌ها برای سوبه‌های مورد مطالعه استفاده شد. قطر هاله رشد نداشتن، اندازه‌گیری شد و میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها مطابق با روش CLSI⁴ 2018 به‌دست آمد [۱۱]. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استفاده شده در این مطالعه شامل:

- ۱- آنتی‌بیوتیک‌های رایج گروه بتالاکتام که از ساخت پیتیدوگلیکان‌های دیواره سلولی باکتری مانع می‌کنند و در نتیجه باعث تخریب دیواره سلولی باکتریایی می‌شوند (آموکسی‌سیلین - کلاونیک اسید (۳۰ μg)، ایمی‌پنم (۱۰ μg))
 - ۲- آنتی‌بیوتیک رایج گروه آمینوگلیکوزید که با اتصال به زیرواحد ۳۰ S ریبوزوم مانع از سنتز پروتئین در باکتری می‌شود (جنتامایسین (۱۰ μg))
 - ۳- آنتی‌بیوتیک رایج گروه تتراسایکلین‌ها که همانند آمینوگلوکزیدها به زیرواحد ۳۰ S ریبوزوم متصل می‌شوند و از سنتز پروتئین در باکتری جلوگیری می‌کند (تتراسایکلین (۳۰ μg))
 - ۴- آنتی‌بیوتیک‌های رایجی که به زیرواحد ریبوزومی ۵۰ S متصل می‌شوند و مانع از سنتز پروتئین می‌گردند (کلرامفنیکل (۳۰ μg)، اریترومایسین (۱۵ μg)، کلیندامایسین (۱۰ μg))
 - ۵- آنتی‌بیوتیک‌های رایج سفالوسپورینی که مانند پنی‌سیلین‌ها بر دیواره باکتری‌ها مؤثرند و از طریق مهار سنتز دیواره سلول باکتری موجب ناپایداری اسموتیک باکتری می‌شوند (سفتازیدیم (۳۰ μg)، سفازولین (۳۰ μg))
 - ۶- آنتی‌بیوتیک رایج گروه سولفونامیدها که مانع از سنتز اسید نوکلئیک‌ها می‌شود (سولفامتوکسازول (۱۰ μg)).
- در این پژوهش سوبه‌های دارای مقاومت چنددارویی شناسایی شد و از آنها برای ادامه کار استفاده شد.

نانوذرات چون اندازه کوچکی دارند، می‌توانند به‌راحتی از غشا عبور کنند [۶] و به دلیل ترکیب شدن با اجزای مختلفی در سلول باعث اختلال گسترده در عملکرد باکتری می‌شوند که می‌توان از این خاصیت آنها برای از بین بردن باکتری‌ها استفاده کرد [۷]. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های مفیدی هستند که توانایی مهار میکروب‌های بیماری‌زا را دارند و بر بیان ژن‌های ویروالانس آن‌ها مؤثرند [۸]. در بین انواع پروبیوتیک‌ها، سوبه‌های مختلف لاکتوباسیلوس تأثیر بیشتری دارند و می‌توانند به‌تنهایی یا به همراه مواد ضدباکتریایی مختلف از بیان ژن‌های عامل ویروالانس میکروب‌ها جلوگیری کنند [۹]. امروزه پروبیوتیک حاصل از لاکتوباسیلوس‌ها به دلیل داشتن خصوصیات ضد میکروبی مانند تجمع‌پذیری، از اتصال و استقرار باکتری‌های پاتوژن به بدن میزبان ممانعت می‌کنند و راهکار جدیدی برای کنترل بیماری‌هایی مانند انواع سرطان‌ها هستند [۸]. هدف این مطالعه، تعیین تأثیر ضد میکروبی نانو ذرات نقره و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانترام بر بیان ژن جزو مهم از این سیستم افلاکس پمپ به نام MexA در نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا دارای مقاومت چند دارویی است.

۲. مواد و روش‌ها

تهیه و شناسایی سوبه‌های سودوموناس آئروژینوزا

در این مطالعه که به‌صورت توصیفی-مقطعی در یک بازه زمانی ۹ ماهه (۱۳۹۹-۱۳۹۸) انجام شد ۴۹ سوبه باکتریایی سودوموناس آئروژینوزا از ۱۱ آزمایشگاه تشخیص طبی شهر مشهد جمع‌آوری شد. نخست تمام سوبه‌های جمع‌آوری‌شده در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس به‌منظور شناسایی سودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری‌شده، از آزمون‌های تشخیصی رنگ‌آمیزی گرم، رشد در محیط مک‌کانکی آگار، SIM¹، MB²، آزمون اکسیداز، کاتالاز، اوره آز، واکنش در محیط TSI³، تست OF، بررسی تحرک، رشد در محیط ستریماید آگار (سیمون سترات آگار) و رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس هینتون آگار استفاده گردید [۸]. سوبه‌هایی که تأیید هویت شدند در محیط کشت تجاری LB Broth دارای ۲۰ درصد گلیسرول در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نمونه استاندارد باکتری مورد استفاده در این پژوهش ATCC27853 *Pseudomonas aeruginosa* بود که به‌صورت لیوفیلیزه خریداری گردید [۱۰]. شایان ذکر است که پژوهش حاضر مطابق با پروتکل

3 Triple Sugar Iron
4 Clinical and Laboratory Standards Institute

1 Sulfide Indole Motility
2 Eosin Methylene Blue

استخراج DNA و بررسی ژن MexA پمپ افلاکس با استفاده از تکنیک PCR قبل از تیماردهی سوبه‌های دارای مقاومت چند دارویی با نانوذرات و پروبیوتیک برای اطمینان از وجود ژن MexA، استخراج DNA شده و سپس تکنیک PCR به کار گرفته شد تا از وجود ژن موردنظر اطمینان حاصل شود. استخراج DNA با کیت استخراج DNA (Qiagen, Hilden, Germany) و مطابق روش کار شرکت سازنده انجام شد. پرایمرها پس از طراحی، برای سنتز به شرکت سیناکلون ایران سفارش داده شدند (جدول ۱). واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲ میکرولیتر (ایران، سیناکلون) PCR master mix 5X دارای Taq DNA ۵ U/μl، polymerase، ۳ mM MgCl₂/۵Mm، ۲/۵ mM از dNTPs، ۱۰ میکرولیتر از هریک از پرایمرها، ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۶

میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل با استفاده از گرادپانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) با برنامه دمایی، یک سیکل دناتوراسیون اولیه شامل: ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه، واسرشته شدن ۱ در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر ۲ در ۵۲ درجه برای ۳۰ ثانیه، طویل شدن ۳ در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه و یک بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه انجام شد. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد و در کنار DNA Ladder 100bp در بافر TBE به مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۱۰۰ انجام شد [۱۱]. برای رنگ‌آمیزی ژل، آن را به مدت ۱۵ دقیقه در تانک دارای اتیدیوم بروماید قرار داده شد و نتایج توسط دستگاه Geldocument با نور uv مشاهده شد. در کل واکنش‌های PCR از آب به‌عنوان کنترل منفی و از باکتری دارای ژن MexA به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد [۱۲].

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در Real-Time PCR و PCR

ژن	توالی نوکلئوتیدی	Tm°C	اندازه محصول (bp)
MexA	F: TGGTCGAAGGTCCATTGTGG	۵۳.۹۶	۵۳۰
	R: TTGGCACGTTGACTTTGGAC	۵۳.۲۶	
16S rRNA	F: CCAACCCTTTTCCTTACTTGC	۵۵.۳	۱۹۹
	R: CATCAACTTCACCTTCACGC	۵۵.۳	

سویا برات (TSB) استریل بود، استفاده گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذرات نقره و پروبیوتیک به‌صورت جداگانه با رقت‌های مشخص به محیط TSB اضافه شد و رقیق‌سازی سریال انجام شد. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی استاندارد به همه چاهک‌ها اضافه شد. همچنین اولین ردیف کنترل مثبت (محیط و سوسپانسیون میکروبی) و دومین ردیف کنترل منفی (محیط و ماده تیمار) در نظر گرفته شد. میکروپلیت‌ها در انکوباتور شیکردار به مدت ۲۴ ساعت با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه انکوبه شدند.

استخراج RNA

استخراج RNA با استفاده از کیت Total RNA Extraction mini Kit (یکتا تجهیز آما، ایران) و پس از تیمار کردن با نانوذرات نقره، پروبیوتیک و نانوذرات نقره به همراه پروبیوتیک (رقت بعد از MIC) صورت گرفت. بعد از استخراج RNA، برای اطمینان از صحت استخراج و نمونه موردنظر، توسط دستگاه نانودراپ، روش جذب نوری ۲۳۰/۲۶۰ و ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر ارزیابی کمی صورت

تهیه نانوذرات نقره و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلاتناروم

پودر نانوذرات نقره (برند ARMINANO) از شرکت مهندسی پایدار ابتکار آرمینا خریداری شد و برای تهیه سری رقت از نانوذرات از روش رقت‌سازی سریال از نانوذره نقره، سری رقت‌های ۳۱، ۶۲/۲۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ تهیه شد. سوبه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلاتناروم از مرکز پژوهش‌های علمی - صنعتی ایران خریداری شد.

تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد برای نانوذرات نقره و پروبیوتیک

نخست سوسپانسیون باکتری با مقایسه استاندارد نیم مک‌فارلند تهیه شد. و چگالی کدورت با استفاده از اندازه‌گیری جذب در اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر بین ۸ درصد تا ۱۰٪ تأیید شد. از روش برات میکرودايلوشن برای سنجش تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره و پروبیوتیک بر بیان ژن MexA پمپ افلاکس در باکتری استفاده شد. در این روش از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای با ۱۲ ردیف که همه دارای ۱۰۰ میکرولیتر محیط تربیتون

3 Extension

1 Denaturation
2 Annealing

بررسی بیان ژن با استفاده از تکنیک Real-Time PCR

واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر کیت Genet کره جنوبی^۱ به صورت زیر انجام شد: ۱۰ میکرولیتر از Prime Qmaster mix، ۵ میکرولیتر از Depc water، یک میکرولیتر از هر پرایمر [۱۴]، یک میکرولیتر از Rox dye و دو میکرولیتر از cDNA استفاده شد. تکثیر قطعه‌ای مورد نظر مطابق جدول ۲ در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن خانگی 16s rRNA به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. تحلیل داده‌ها در نمونه‌های تیمار شده و کنترل به کمک معادله داده‌ها و رسم نمودارهای مربوطه از LightCycler Relative Quantification Software استفاده شد. داده‌های مربوط به تعبیر بیان ژن MexA با روش 2- $\Delta\Delta CT$ با فرض کارایی ۱۰۰ درصد و با استفاده از آزمون آماری T مستقل در سه گروه تحلیل شد.

گرفت. RNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد [۱۵].

ساخت cDNA

برای سنتز cDNA از کیت cDNA Synthesis Kit (یکتا تجهیز آزما، تهران) استفاده شد. در این روش پس از انکوبه کردن RNA استخراج شده به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، فرایند نسخه‌برداری معکوس انجام گردید. این فرایند با ۲ میکرولیتر Random Primer، ۰/۸ میکرولیتر آنزیم AMV Reverse Transcriptase، ۲ میکرولیتر 10mM Dntp، یک میکرولیتر RNasin® Ribonuclease Inhibitor و دو میکرولیتر AMV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer، در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به طول ۶۰ دقیقه انجام شد و سپس ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد (برای غیرفعال‌سازی آنزیم RT) در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد.

جدول ۲. مشخصات ترموسایکلر در Real-Time PCR

No.	Step	Temperature(OC)	Time
۱	Initial denaturation واسرشت اولیه	۹۵	۶۰ ثانیه
۲	Denaturation واسرشت:	۹۵	۳۰ ثانیه
۳	Annealing اتصال:	۵۹	۴۰ ثانیه
۴	Extention گسترش:	۷۲	۱ دقیقه
Cycle(2-4)		۳۵	

۳. یافته‌ها**جداسازی و تشخیص سویه‌ها**

تمامی ۴۹ سویه سودوموناس آئروژینوزا که از ۱۱ آزمایشگاه تشخیص طبی سطح شهر مشهد جمع‌آوری شدند توسط آزمون‌های تشخیصی و تأییدی میکروبیولوژی و بیوشیمیایی تأیید هویت شدند.

نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی

در این مرحله با توجه به استاندارد CLSL، نتایج گزارش گردید (جدول ۳). نتایج نشان داد که تمام سویه‌ها دارای مقاومت به بیش از دو آنتی‌بیوتیک داشتند؛ بنابراین از همه سویه‌ها برای ادامه کار استفاده شدند

جدول ۳. نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام

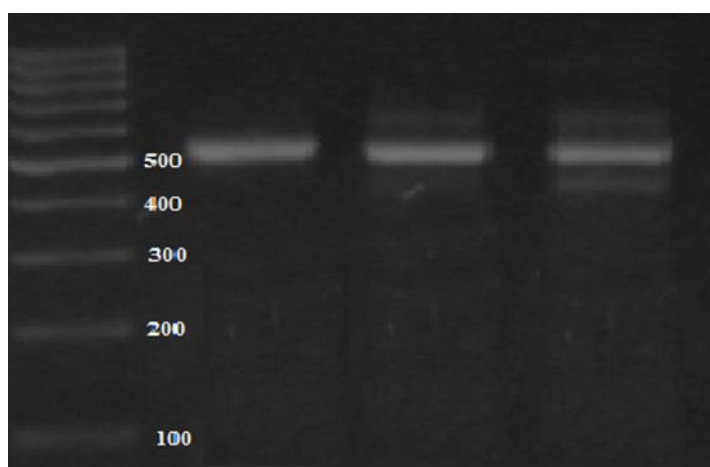
دیسک آنتی‌بیوتیک	حساس (درصد)	نیمه‌حساس (درصد)	مقاوم (درصد)
آموکسی‌سیلین-کلاونیک اسید (۳۰)	(۰)۰	(۰)۰	(۱۰۰)۴۹
جنتامایسین (GM10)	(۰)۰	(۰)۰	(۱۰۰)۴۹
کلیندامایسین (CC2)	(۰)۰	(۰)۰	(۱۰۰)۴۹
ایمی‌پنم (IMP10)	(۲۶/۵۳)۱۳	(۱۸/۳۶)۹	(۳۴/۶۹)۱۷
تتراسایکلین (TE30)	(۰)۰	(۰)۰	(۱۰۰)۴۹
سفتازیدیم (CAZ30)	(۰)۰	(۰)۰	(۱۰۰)۴۹
کلرامفنیکل (CH30)	(۶۳/۲۶)۳۱	(۱۴/۲۸)۷	(۲۲/۴۴)۱۱

مقاوم (درصد)	نیمه‌حساس (درصد)	حساس (درصد)	دیسک آنتی‌بیوتیک
۴۹ (۱۰۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	سفاژولین (CZ30)
۴۹ (۱۰۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	اریترومايسين (E15)
۴۹ (۱۰۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	سولفامتوکسازول (SXI)

نتایج تکثیر ژن حاصل از روش PCR

تکثیر ژن پمپ افلاکس MexA در سویه‌های دارای مقاومت چند دارویی، وجود باند ۵۳۰ bp در ژل الکتروفورز را نشان داد. سویه‌های

دارنده ژن مورد نظر به‌عنوان کنترل مثبت (شکل ۱) در نظر گرفته شدند. نتایج این مرحله نشان داد که تمام سویه‌های دارای مقاومت چند دارویی واجد ژن MexA بودند.



شکل ۱. نتایج الکتروفورز حاصل تکثیر ژن MexA

(از چپ به راست: مارکر، کنترل مثبت، نمونه‌های مثبت حاوی ژن MexA، طول قطعه مورد نظر ۵۳۰ جفت باز است)

در شکل ۳ منحنی تکثیر دستگاه Real time PCR نمونه‌های از سودوموناس آئروژینوزای بدون تیمار و تیمار شده با نانوذرات نقره و پروبیوتیک و ژن کنترل داخلی با رنگ‌های مختلف نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود ژن‌هایی که دارای بیان بیشتر بوده‌اند دارای Ct کمتر بودند که در اینجا Ct نمونه‌های کنترل داخلی (16s rRNA) کمتر بوده و در منحنی زودتر وارد فاز Exponential شده است و نمونه‌های باکتری پس از تیمار با نانوذرات نقره و نانوذرات نقره به همراه پروبیوتیک دارای بیان کمتر در ژن و Ct بیشتری می‌باشند.

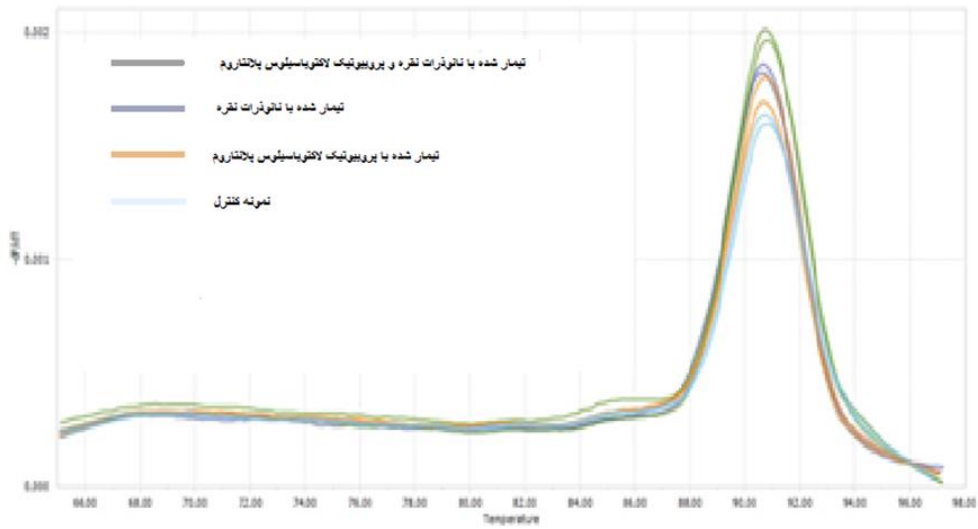
بیان ژن MexA در سویه‌های تیمار شده با مهارکننده نانوذرات و تأثیر هم‌افزای نانوذرات نقره و پروبیوتیک تفاوت معنادار دارد ولی نانوذرات نقره تأثیر بیشتری نسبت به تیمار با پروبیوتیک بر روی بیان ژن دارند و اثر هم‌افزای نانوذرات با پروبیوتیک بیشترین تأثیر را بر کاهش بیان ژن MexA دارد و بر اساس نتایج به‌دست آمده از سنجش بیان ژن (Pvalue) اختلاف آماری معنادار در بیان ژن بین سه گروه وجود داشت.

نتایج آزمون MIC

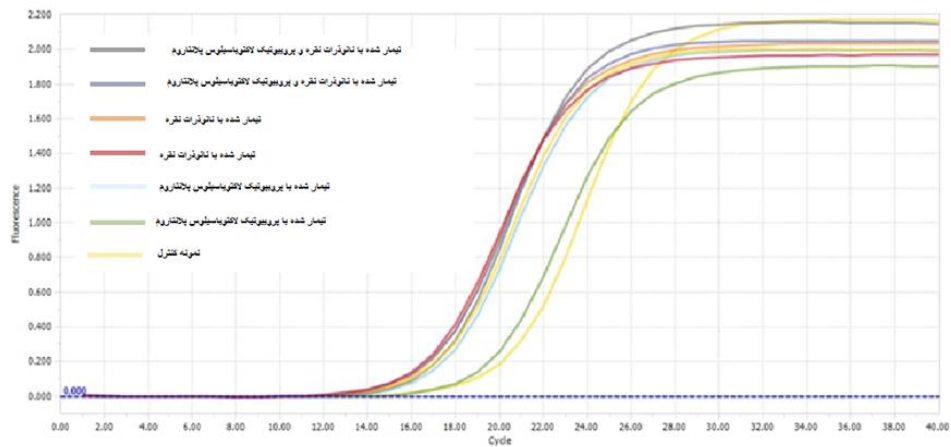
نتایج بررسی MIC یا حداقل غلظت مهار رشد سویه‌های باکتری نشان داد که بهترین غلظت کشندگی سلول‌ها برای نانوذرات نقره ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتروم ۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

بیان ژن MexA بعد از تیماردهی با مهارکننده‌های پمپ افلاکس

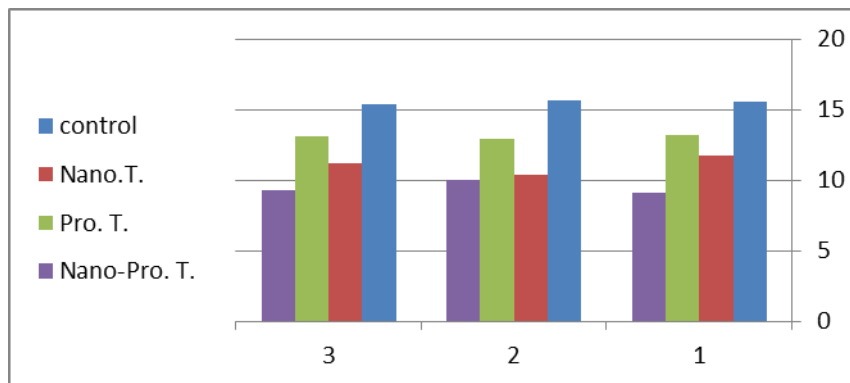
برای مقایسه تأثیر نانوذرات نقره و پروبیوتیک و تأثیر هم‌افزای آنها بر بیان ژن MexA، بیان ژن در چهار گروه سلولی شامل: تیمار شده با نانوذرات نقره، تیمار شده با پروبیوتیک، تیمار شده با نانوذرات نقره به همراهی پروبیوتیک و تیمار نشده با استفاده از تحلیل منحنی ذوب^۱ و منحنی تکثیر با سه بار تکرار بررسی گردید.



شکل ۲. آنالیز منحنی ذوب (Melting curve).



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



شکل ۴. نمودار مقایسه بیان ژن MexA در نمونه‌های کنترل و نمونه‌های تیمار شده با سه تکرار

۴. بحث و نتیجه‌گیری

سودوموناس آئروژینوزا به دلیل ایجاد عفونت‌های شدید، مرگ‌ومیر گسترده‌ای را در بیماران دارای ضعف سیستم ایمنی ایجاد می‌کند [۱۵]. همچنین سودوموناس آئروژینوزا عامل عفونت مزمن تنفسی و دلیلی اصلی مرگ‌ومیر بیماران دارای سیستمیک فیبروزیس (CF) است [۱۶]. مطالعات نشان می‌دهد که مصرف آنتی‌بیوتیک‌های رایج، قادر به کنترل عفونت این باکتری نیست [۱۷] و دلیل این شکست، کسب مکانیسم‌های مقاومت چند دارویی این باکتری است [۱۸]. سیستم‌های پمپ افلاکس غشایی خصوصاً سیستم پمپ MexAB-oprM مهمترین نقش را در کسب مقاومت ذاتی باکتری به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها دارد [۱۹، ۲۰]. در سال‌های اخیر فراوانی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو (MDR) در سراسر جهان رو به افزایش است [۲۱]. مقاومت اغلب سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلوکوزیدها، کینولون‌ها و بتالاکتام‌ها است [۲۲]. در مطالعه حاضر ارزیابی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، از روش انتشار دیسک نشان داد که تمام ۴۹ سویه به بیش از دو آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. مطالعه چندر و همکاران در سال ۲۰۱۲ که در نپال انجام گرفت میزان مقاومت سویه‌ها را مشابه نتایج این تحقیق گزارش کرد [۲۳]. همچنین در سال ۲۰۱۴ در گیلان، شیرانی و همکاران، مقاومت به توبرامایسین را ۲۱ درصد، آمیکاسین را ۱۱ درصد و جنتامایسین را ۹۷ درصد گزارش کردند [۲۴]. مقاومت‌های به‌وجودآمده نسبت به جنتامایسین و توبرامایسین از این مطالعه با نتیجه به‌دست‌آمده مختاری و همکاران در سال ۱۳۹۵ مشابه است [۲۵]. همچنین باقری و همکاران در سال ۱۳۹۵ میزان مقاومت نسبت به جنتامایسین آمیکاسین را که در سودوموناس آئروژینوزا گزارش کردند مشابه تحقیق حاضر بود [۲۶]. در مطالعه طباطبایی و همکاران در سال ۱۳۹۶، اثر ضد میکروبی جنتامایسین علیه سودوموناس آئروژینوزا پس از آمینوگلیکوزیدهای توبرامایسین و آمیکاسین قرار داشت که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت ندارد [۲۷]. درصد مقاومت چند دارویی در مطالعه حاضر، حدود چهار برابر میزان گزارش شده در مطالعات مشابه است [۲۸].

در خصوص مقاومت سودوموناس، مطالعات زیادی صورت گرفته که نتایج این مطالعات برحسب زمان و مکان متفاوت بوده است. سودوموناس آئروژینوزا با مکانیسم‌های متفاوتی مقاومت به داروهای ضد میکروبی را کسب می‌کند. کاهش نفوذپذیری باکتری به عوامل ضد میکروبی، مهم‌ترین عوامل مقاومت در سودوموناس آئروژینوزا به‌شمار می‌روند [۲۹، ۳۰]. در این میان، سیستم‌های

پمپ افلاکس غشایی، نقش مهمی را دارند [۳۱، ۳۲]. سودوموناس آئروژینوزا پتانسیل بیان ۱۲ نوع پمپ تراوشی مقاومت چند دارویی با عنوان Mex-Type Multidrug Resistance Efflux Pump را دارد که MexAB-oprM فراوان‌تر و مهم‌تر از بقیه هستند [۳۳]. در ایزوله‌هایی که نسبت به بیش از دو آنتی‌بیوتیک مختلف مقاومت داشتند بیان ژن MexA مشاهده شد. گلاویر و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که پمپ‌های MexAB در تخلیه‌سازی آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری سودوموناس آئروژینوزا نقش مهمی دارند [۳۴]. این نتیجه در همین سال در تحقیق اوگویانی و همکارانش نیز مجدداً ارائه گردید [۳۵].

مطالعات گذشته نشان داده است که نانوذرات فلزی مانند اکسید نقره به دلیل داشتن توان ضد میکروبی می‌توانند به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها مورد بررسی باشند [۳۶، ۳۷] و نتایج این بررسی این رویکرد را تأیید می‌کند. نانوذرات نقره در این پژوهش مستقیماً توانستند بیان ژن‌های MexA را کم کنند و با هم‌افزایی با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم اثری مهاری پروبیوتیک را افزایش دهند. فرانسوی جی ان لوئیجی و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که نانوذرات نقره به‌عنوان عوامل ضدباکتریایی در درمان بیماری‌های عفونی، درهم شکستن مقاومت چند دارویی برای بسیاری از باکتری‌های پاتوژن انسانی مفید هستند [۳۸]. مطالعات دوسومو و همکارانش در سال ۲۰۱۵ و آیزی در سال ۲۰۲۰ نشان داد که نانوذرات آنتی‌بیوتیک‌های نسل آینده هستند و نسبت به فلزات، سمیت بسیار پایینی دارند [۳۹، ۴۰]. نتایج تحقیق رشید و همکارانش در سال ۲۰۲۱ نیز مؤید سودمندی نانوذرات نقره در مهار باکتری‌های پاتوژن انسانی بوده است [۴۱]. دودی و همکارانش نشان دادند که نانوذرات در باسیل‌های گرم منفی بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام با طیف گسترده از جمله سودوموناس آئروژینوزا بزرگ‌ترین قطر هاله رشد نداشتن را دارند [۴۲]. این نتیجه برای سایر نانوذرات و تأثیر آنها بر مهار باکتری سودوموناس آئروژینوزا انجام شده است. نانوذرات روی و اکسید روی نیز می‌توانند مانع از رشد سودوموناس آئروژینوزا باشند [۴۳، ۴۴] و نانوذرات آهن نیز با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌توانند نقش مهارکنندگی بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا داشته باشند [۴۵].

پروبیوتیک‌ها توانایی مهار میکروب‌های بیماری‌زا را دارند و بر بیان ژن‌های ویروالانس باکتری‌ها مؤثرند [۹]. آنها می‌توانند توسط مکانیسم‌های عملکردی متنوع پروبیوتیک‌ها و متابولیت‌های تولیدشده توسط آنها، از بیان ژن‌های عامل ویروالانس میکروب‌ها

نقره انجام داده‌اند، نشان داده‌اند که هم‌افزایی اکسیدمس- نقره اثر ضدباکتریایی قوی تری نسبت به نانوذرات روی- نقره دارد (۵۰). همچنین مطالعه زندگانی و دولت‌آبادی در سال ۲۰۲۰ در ارتباط با بررسی هم‌افزایی خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره و آنتی‌بیوتیک ای‌می‌پنم علیه باکتری‌های آسینتوباکتر باثومانی^۱ می‌باشد و نتایج آن نشان داد که هم‌افزایی نانوذرات نقره با آنتی‌بیوتیک ای‌می‌پنم تأثیرات ضدباکتریایی قوی‌تر نسبت به استفاده تنها از آنتی‌بیوتیک داشته است [۵۱] و مطالعه شعبانی و همکاران در سال ۲۰۲۰ در خصوص بررسی تأثیرات ضدباکتریایی نانوذرات نیترات نقره به‌تنهایی و همراه شده با آنتی‌بیوتیک ای‌می‌پنم بر باکتری سودوموناس آروژینوزا^۲ نشان داد که میزان اثربخشی آنتی‌بیوتیک همراه شده با ای‌می‌پنم، بسیار بیشتر از آنتی‌بیوتیک تنها است [۵۲]. با توجه به پتانسیل بالای نانوذرات نقره و پروبیوتیک بر مهار رشد سودوموناس آروژینوزا می‌توان از این مواد به‌صورت جداگانه برای کنترل عفونت‌های سودوموناس آروژینوزا استفاده کرد ولی کاربرد هم‌افزایی آنها مؤثرتر می‌باشد به‌ویژه به دلیل اینکه پروبیوتیک‌ها برای بدن ترکیبات مفیدی هستند و آسیبی به آن وارد نمی‌کنند، کاربرد آنها در کنار نانوذرات به دلیل اینکه میزان نانوذرات را در ترکیبات ضدباکتریایی هم‌افزا کاهش می‌دهند این ترکیب هم‌افزای برای کنترل عفونت مفیدتر است.

سیاسگزاری

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه شماره ۱۶۲۳۳۷۸۸۳ برای اخذ درجه کارشناسی‌ارشد در رشته زیست‌شناسی سلولی و مولکولی از دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد بود. بدین‌وسیله از مدیریت محترم گروه زیست‌شناسی سپاسگزاری می‌گردد.

جولوگیری کرد. در این تحقیق، پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتروم اثر ضد میکروبی در سودوموناس آروژینوزا را نشان داده است. البته اثر مهارکنندگی آن در مجاورت نانوذرات نقره افزایش چشمگیر دارد و نتایج بررسی MIC و بیان ژن MexA در این پژوهش نشان داد که نانوذرات نقره و پروبیوتیک به‌تنهایی یا همراه با هم توانایی کاهش بیان ژن MexA را دارند. در برخی مطالعات این نتیجه تأیید نمی‌شود؛ برای مثال مطالعه شریف و امینی در سال ۲۰۱۹ هم‌افزایی نانوذرات اکسید آهن و پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم نسبت به ایزوله‌های کنترل تغییر بیان ژن MexA را نشان نداد [۴۶] همچنین چراغی نشان داد که اثر نانوذرات به‌تنهایی بیشتر از هم‌افزایی آن با پروبیوتیک‌هاست [۴۷]. به دلیل اینکه استفاده از پروبیوتیک، راهکار بی‌ضرر و سودمندی برای درمان عفونت‌ها است پروبیوتیک‌ها می‌توانند در سلامتی میزبان مؤثر باشند [۸]. در این تحقیق از آنها استفاده شده است و خاصیت ضدباکتریایی آنها اثبات شده است اگرچه این تأثیر به میزان اثر نانوذرات نقره نیست. پیش‌تر نیز برخی از محققان استفاده از آنها را راهکاری مهم و عملی برای پیشگیری و درمان عفونت‌های انسانی پیشنهاد داده بودند [۴۸]. کرمانشاهی در سال ۲۰۱۵ نشان داد که لاکتوباسیلوس پلانتروم اثر بازدارندگی بر تولید علائم مولکولی، هموسرین لاکتون و تولید الاستاز در سودوموناس آروژینوزا را دارد [۹]. ارشادیان در سال ۲۰۱۵ اثبات کرد که لاکتوباسیلوس کازهای اثر ضد میکروبی و نیز تجمع‌پذیری قابل‌ملاحظه‌ای با باکتری‌های بیماری‌زا داشت و شاید بتوان از آن به‌عنوان کاندیدای مناسب برای کنترل بیماری استفاده کرد [۴۹].

درخصوص هم‌افزایی نانوذرات با سایر عوامل ضدباکتریایی، بررسی‌های متعددی انجام شده است. در مطالعه‌ای که آساموا و همکارانش در سال ۲۰۲۰ در ارتباط با بررسی مقایسه‌ای هم‌افزایی تأثیرات ضدباکتریایی نانوذرات اکسید مس- نقره و اکسید روی-

References

- [1]. Grosjean M, Guénard S, Giraud C, Muller C, Plésiat P and Juarez P. Targeted Genome Reduction of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 Led to the Development of Hypovirulent and Hypersusceptible rDNA Hosts. *Front. Bioengineering. Biotechnology*. 2021; 9:640-650.
- [2]. Grainha T, Jorge P, Alves D, Lopes SP and Pereira MO. Unraveling *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* Communication in Coinfection Scenarios: Insights Through Network Analysis. *Front. Cell. Infect. Microbiology*. 2020; 10:550-559.
- [3]. Yu H, Chen S, Cao P. Synergistic bactericidal effects and mechanisms of low intensity ultrasound and antibiotics against bacteria. *Ultrason Sonochem*. 2012; 19 (3):377-382.
- [4]. Alvarez-Ortega C, Olivares J, and Martínez J. L. RND multidrug efflux pumps: what are they good for? *Front. Microbiol*. 2013; 4(7):26-33.
- [5]. Dreier J, Ruggerone PJFim. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2015; 6:66-714.
- [6]. Albadiri V, Molavi F, Tehranipoor M. 2021. The effect of silver nanoparticles on blaTEM gene expression in beta-lactamase-resistant samples in *Escherichia coli*. *Biology journal of Microorganism*. 2021;39(2):87-100.

- [7]. Kumar P, Love R, Hamlet S. Silver Nanoparticles at Biocompatible Dosage Synergistically Increases Bacterial Susceptibility to Antibiotics. *Front. Microbiol.* 2020; 11:1074-85.
- [8]. Wang Y, Jiang Y, Deng Y, Yi C, Wang Y, Ding M, Liu J, Jin X, Shen L, He Y, Wu X, Chen X, Sun C, Zheng M, Zhang R, Ye H, An H and Wong A. Probiotic Supplements: Hope or Hope? *Front. Microbiol.* 2020; 11:160.
- [9]. Zhixiang Q, Dan Z, Yu Y, Hui Z, Daijie C. Antibacterial Activity of Lactobacillus Strains Isolated from Mongolian Yogurt against Gardnerella vaginalis", *BioMed Research International*, 2020; 86(18):354-361.
- [10]. 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(2):68-74
- [11]. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th ed. CLSI supplement M100S. CLSI, PA. 2018:38-40.
- [12]. 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(4):762-9.
- [13]. 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(1):754-761.
- [14]. Cavallo JD, Fabre R, Leblanc F, Nicolas-Chanoine MH, Thabaut A; Groupe d'Etude de la Résistance de Pseudomonas aeruginosa aux Bêtalactamines. Antibiotic susceptibility and mechanisms of beta-lactam resistance in 1310 strains of pseudomonas aeruginosa: a French multicentre study (1996). *J Antimicrob Chemother.* 2000;46(1):133-6.
- [15]. Diaz Iglesias Y, Van Bambeke F. Activity of Antibiotics against Pseudomonas aeruginosa in an in Vitro Model of Biofilms in the Context of Cystic Fibrosis: Influence of the Culture Medium. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020; 24:64(4): 24-19.
- [16]. Acosta N, Waddell B, Heirali A, Somayaji R, Surette MG, Workentine ML, Rabin HR and Parkins MD. Cystic Fibrosis Patients Infected with Epidemic Pseudomonas aeruginosa Strains Have Unique Microbial Communities. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020; 10:173-189.
- [17]. Cigana C, Ranucci S, Rossi A, De Fino I, Melessike M, Bragonzi A. Antibiotic efficacy varies based on the infection model and treatment regimen for Pseudomonas aeruginosa. *Eur Respir J.* 2020;5:55(3):188-205.
- [18]. Ruiz-Roldán L, Rojo-Bezares B, de Toro, M. et al. Antimicrobial resistance and virulence of Pseudomonas spp. among healthy animals: concern about exolysin ExlA detection. *Sci Rep.* 2020; 10(1), 57-68.
- [19]. Glavier M, Puvanendran D, Salvador D. et al. Antibiotic export by MexB multidrug efflux transporter is allosterically controlled by a MexA-OprM chaperone-like complex. *Nat Commun.* 2020;11(1): 39-48.
- [20]. Oswaldo Gomez N, Tetard, Laurent Ouerdane A, Laffont L, Catherine- Brutesco, Ball G, Lobinski R, Yann Denis, Plésiat P, Llanes C, Arnoux P, Voulhoux R *bioRxiv.* 2020;5(13):92-111.
- [21]. Shahrazi Zahedani S, 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", *International Journal of Microbiology.* 2021;55(1):55-61.
- [22]. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. perspectives in medicinal chemistry. 2014;6(1):17-24.
- [23]. Shander RM, Anil C Antimicrobial Suseptibility Patterns of pseudomonas aeruginosa clinical isolates at tertiary care hospital in kathmando, nepal. *Asian J Pharm Clin Res.* 2013;6(3): 235-238.
- [24]. Salimi chirani A, Dabiri H, Nikokar I, Ebrahim pour komleh M, Dousdar F, Goudarzi H, et al. Evaluation of type IV pilin sub groups in Pseudomonas aeruginosa isolated from environmental samples, cystic fibrosis and burn patients. *Iran J Med Microbiol.* 2014; 8 (3):1-7.
- [25]. Mokhtari A.R., Zahraei Salehi T., Amini K., Shahcheraghi F. Isolation Pseudomonas aeruginosa bacteria and genes integronclass 1 of subclinical mastitis in dairy cows in tehran. *Veterinary Researchs Biological Products.* 2016;29(2):111:37-44.
- [26]. Bageri O, Olad G R, Shahcheraghi F, Sorori zanjani R. Isolation and identification of strains of Imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated in clinical samples from 4 major hospitals of tehran, using MIC method. *sjimu.* 2017; 24 (6) :159-168
- [27]. Tabatabaai R, Siasi E, Rafiei Moslehi Mehr F. Isolation of bla_{vim} gene in Antibiotic resistant Pseudomonas aeruginosa from hospitals. *New Cellularand Molecular Biotechnology Journal.* 2018;8(29):97-106.
- [28]. Wahab S, Khan T, Adil M, Khan A. Mechanistic aspects of plant-based silver nanoparticles against multi-drug resistant bacteria. *Heliyon.* 2021;1;7(7):74-84
- [29]. Langendonk RF, Neill DR, Fothergill JL. The Building Blocks of Antimicrobial Resistance in Pseudomonas aeruginosa: Implications for Current Resistance-Breaking Therapies. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:665759.
- [30]. Plant AJ, Dunn A, Porter RJJ Eroa-it. Ceftolozane-tazobactam resistance induced in vivo during the treatment of MDR Pseudomonas aeruginosa pneumonia. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2018;16(5):367-8.
- [31]. Grosjean M, Guénard S, Giraud C, Muller C, Plésiat 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(1):64-45.
- [32]. Zahedi bialvaei A, Rahbar M, Hamidi-Farahani R, Asgari R, Esmailkhani A, Mardani dashti Y, Soleiman-Meigooni S, Expression of RND efflux pumps mediated antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa clinical strains, *Microbial Pathogenesis.* 2021; 15(3):89-104.
- [33]. Langendonk RF, Neill DR, Fothergill JL. The Building Blocks of Antimicrobial Resistance in Pseudomonas aeruginosa: Implications for Current Resistance-Breaking Therapies. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 11(1):66-75.
- [34]. Kumarasinghe WCH, Silva M D A, Fernando, L, Palliyaguru PS, Jayawardena M, Shimomura SSN, Fernando TDCP, Gunasekara PM, Jayaweera A, "One-Pot Reducing Agent-Free Synthesis of Silver Nanoparticles/Nitrocellulose Composite Surface Coating with Antimicrobial and Antibiofilm Activities", *BioMed Research International.* 2021; 66(1):61-74.
- [35]. Ugwuanyi F.C., Ajayi A., Ojo D.A. et al. Evaluation of efflux pump activity and biofilm formation in multidrug resistant clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa isolated from a Federal Medical Center in Nigeria. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2020; 2(1): 11. -21.
- [36]. Hemeg HA. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *International journal of nanomedicine.* 2017; 12:82-91.
- [37]. Lisa M. Stabryla, Kathryn A. Johnston, Nathan A. Diemler, Vaughn S. Cooper, Jill E. Millstone, Sarah-Jane Haig, Leanne M. Gilbertson. Role of bacterial motility in differential resistance mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. *Nature Nanotechnology,* 2021; 10(1):31-38.
- [38]. Jacouton E, Chain F, Sokol H, Langella P, Bermudez-Humaran

- LG. Probiotic Strain Lactobacillus Casei BL23 Prevents Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8(1):15-33.
- [39]. Dosunmu E, Chaudhari AA, Singh SR, Dennis VA, Pillai SR. Silver-coated carbon nanotubes downregulate the expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes: a potential mechanism for their antimicrobial effect. *International journal of nanomedicine*. 2015; 10(1):4456.
- [40]. Izzi M, Sportelli MC, Tursellino L, Palazzo G, Picca RA, Cioffi N, López Lorente ÁI. Gold Nanoparticles Synthesis Using Stainless Steel as Solid Reductant: A Critical Overview. *Nanomaterials*. 2020; 10(4):622.
- [41]. 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 (41) :67-82
- [42]. Doudi M, Naghsh N, Heiedarpour A. The effect of silver nanoparticles on Gram-negative Bacilli Resistant to Extended Spectrum B-Lactamase Enzymes. *Medical Laboratory Journal*. 2011; 50(2):44-51.
- [43]. Dosunmu E, Chaudhari AA, Singh SR, Dennis VA, Pillai SR. Silver-coated carbon nanotubes downregulate the expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes: a potential mechanism for their antimicrobial effect. *International journal of nanomedicine*. 2015; 10(1):50-75.
- [44]. Lee JH, Kim YG, Cho MH, Lee J. ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiological research*. 2014; 169(12):888-96.
- [45]. Haney CE. Effects on Iron Nanoparticles on *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms: University of Dayton; 2011, 322PP.
- [46]. Sharif R, Amini K. Effect of Iron Oxide Nanoparticles and Probiotic *Bifidobacterium bifidum* on *MexA* Gene Expression in Drug Resistant Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Research in Medicine*. 2019; 43 (3) :118-123.
- [47]. Cheragia S, Rashidian E, Birjandi M, Mahmoodnia L. Antagonistic effect of isolated probiotic bacteria from natural sources against intestinal *Escherichia coli* pathotypes. *Electronic physician*. 2019; 10(3):6534.
- [48]. Sadari H, Hoseini SS, Niakan M & Eini ME. Comparison of cefoxitin disk diffusion and pcr for *mecA* gene methods for detection of methicillin resistant *staphylococcus aureus*. *Daneshvar Medicine* 2015; 22(114): 41-6 [Article in Persian].
- [49]. Ershadian M, Arbab Soleimani N, Ajodani Far H, Vaezi Khakhki M R. The Co-aggregation effects of probiotic *lactobacillus* against some pathogenic bacteria. *Iran J Med Microbiol*. 2015; 9 (3) :14-22
- [50]. Asamoah Cioffi N, Torsi L, Ditaranto. Synthesis and characterization of zinc and copper oxide nanoparticles and their antibacterial activity Author links open overlay panel. 2020; 7: 99-104
- [51]. Zendegani E, Dolatabadi S. The efficacy of imipenem conjugated with synthesized silver nanoparticles against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates, Iran. *Biol Trace Elem Res*. 2019; 6(1):1-11
- [52]. Shahbandeh M, Taati Moghadam M, Mirnejad R, Mirkalantari S, Mirzaei M, The Efficacy of AgNO₃ Nanoparticles Alone and Conjugated with Imipenem for Combating Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Nanomedicine*. 2020; 15: 6905-6916.