

بررسی تاثیر نانوذرات نقره بر بیان ژن *Bla-per1* موثر در استحکام بیوفیلیم در سویه‌های

اسیتوباکتر بومانی مقاوم به آنتی‌بیوتیک، با استفاده از روش

Quantitative Real-Time PCR



توحید پیری قراقیه^{۱*}، سید عطااله سادات شاندیز^۲ و شیدا بیرانوند^۱

^۱ ایران، شهرکرد، دانشگاه آزاداسلامی، واحد شهرکرد، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، تهران، دانشگاه آزاداسلامی، واحد تهران مرکزی، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷

چکیده

اسیتوباکتر بومانی به دلیل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حدت، عامل اصلی عفونت‌های شدید بیمارستانی است. توانایی اسیتوباکتر بومانی در تشکیل بیوفیلیم به بقای آن در شرایط نامساعد محیطی از جمله محیط بیمارستان و تجهیزات پزشکی کمک می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات نانوذرات نقره روی استحکام بیوفیلیم ایزوله‌های بالینی مقاوم به آنتی‌بیوتیک/اسیتوباکتر بومانی می‌باشد. پس از جداسازی و تشخیص افتراقی ۱۰۰ نمونه بالینی اسیتوباکتر بومانی، تعیین مقاومت میکروبی به روش آنتی‌بیوگرام انجام و سویه‌های تشکیل دهنده بیوفیلیم با تست فنوتیپی و ژنوتیپی شناسایی شدند. حداقل غلظت بازدارندگی از رشد سویه‌ها علیه نانوذرات تجاری نقره تعیین و بررسی بیان ژن *Bla-per1* سویه‌های مقاوم تیمار شده با غلظت SubMIC نانوذرات نقره به روش Quantitative Real-Time PCR انجام شد. تعداد ۱۲ نمونه از باکتری‌ها جدا شده مربوط به اسیتوباکتر بومانی به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه بجز کلیستین مقاوم بوده و ساختار بیوفیلیم قوی تشکیل دادند. بررسی مولکولی PCR تایید کننده حضور ژن *Bla-per1* در سویه‌های مقاوم بود. تیمار سویه‌ها با غلظت SubMIC نانوذرات نقره کاهش بیان قابل قبولی در بیان ژن *Bla-per1* در سطح معناداری $P \leq 0.05$ نشان داد. نانوذرات نقره دارای اثرات بیولوژیکی معناداری بر کاهش حدت و بیان ژن‌های مقاومت و تشکیل بیوفیلیم اسیتوباکتر بومانی می‌باشند، بنابراین به عنوان کاندید دارویی می‌توانند مورد توجه قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: اسیتوباکتر بومانی، بیوفیلیم، نانوذرات نقره، ژن *Bla-per1*

* نویسنده مسئول، تلفن: ، پست الکترونیکی: Ata.sadatshandiz@iauctb.ac.ir، Tohidpirie@yahoo.com

مقدمه

وجود مقاومت به این دارو در سال‌های اخیر در میان گونه‌های اسیتوباکتر بومانی در حال افزایش می‌باشد و این ایزوله‌ها معمولاً مولتی‌دراگ رسیستنت (multidrug resistance) یا MDR هستند (۲۳). سویه‌های MDR اسیتوباکتر بومانی ظرفیت ویران‌کننده‌ای برای مقاومت و گردش و انتقال در فضای بیمارستان دارند؛ دلیل این امر توانایی زیاد آن‌ها در تشکیل بیوفیلیم روی سطوح زنده و غیر زنده می‌باشد (۳ و ۲۵). این کوکوباسیل‌ها بر روی

اسیتوباکتر بومانی یک باکتری گرم منفی در ارتباط با عفونت‌های کسب شده از بیمارستان، به خصوص عفونت‌های بخش مراقبت‌های ویژه یا ICU می‌باشد. این عفونت‌ها شامل عفونت‌های باکتریایی از جمله باکتری، پنومونی، عفونت‌های مجاری ادراری، مننژیت و عفونت زخم می‌باشند (۱ و ۱۹). معمولاً عفونت‌های جدی و شدید ناشی از اسیتوباکتر بومانی با استفاده از ایمپنم به عنوان داروی انتخابی مورد درمان قرار می‌گیرند (۲). با این

در پزشکی به بررسی اثرات آن اهمیت داده می‌شود (۱۳). نانوذرات نقره به علت داشتن بار سطحی و نسبت سطح به حجم خود، آنزیم‌ها و DNA میکروارگانیسم‌ها را با تعادل الکترون بین گروه‌های دهنده الکترون مثل تیول، کربوکسیلات، آمید، ایمیدازول، اندول و هیدروکسیل غیر-فعال می‌نماید. تغییرات ضد میکروبی که از رشد باکتری بیماریزا ممانعت می‌کنند، یک هدف مطلوب محسوب می‌شود (۱۷). از آنجا که در زمان تشکیل بیوفیلم هزینه‌های درمان بالا رفته و گران‌بودن درمان‌های فعلی برای مبارزه با بیوفیلم این باکتری و همچنین عدم کارایی کافی این روش‌ها، استفاده از نانوذرات نقره برای درمان می‌تواند راهکار مناسبی تلقی شود. به دلیل مقاومت‌های آنتی-بیوتیکی /سیتوباکتر بومانی، کلاس‌های کمی از آنتی-بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری مورد استفاده قرار گرفته و در نتیجه ایمی‌پنم‌ها و کارباپنم‌ها از مهم‌ترین گزینه‌های مطرح برای درمان آنتی‌بیوتیکی می‌باشند. این آنتی‌بیوتیک‌ها آخرین خط درمانی در مبارزه با عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی، از جمله /سیتوباکتر بومانی می‌باشند. طبق مطالعات، کلید اصلی مقاومت به کارباپنم‌ها را می‌توان در بیان ژن‌های *Bla-per1* جستجو کرد (۱۶). اگرچه حضور و بیان ژن *Bla-per1* به‌طور مستقیم با تشکیل بیوفیلم در /سیتوباکتر بومانی در ارتباط نمی‌باشد اما آنالیز سیلیکویی (*silico analysis*) نشان داد که این ژن در /سیتوباکتر بومانی بر روی پلاسمید حمل شده و با کلاس یک اینتگرون‌ها و ترنسپوزون‌ها در ارتباط است. این عناصر ژنتیکی قابل انتقال معمولاً ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک را حمل کرده و در برخی مواقع تکه‌هایی از ژن‌های متابولیک (که در کنار یکدیگر تجمع دارند) توسط این فرآیند به شکل انتقال ژن افقی (*horizontal gene transfer mechanism*) بین باکتری‌ها منتقل می‌شود (۲). به کمک این مکانیسم مشخص شد که احتمالاً ژن‌های کناری *ABC transporter* و *ATP binding protein* ها که در کنار ژن *Bla-per1* قرار گرفته‌اند به

سطوح مختلف از جمله تجهیزات پزشکی و انواع دستگاه‌های در ارتباط با پزشکی همچون کاتترهای وریدی و ادراری و لوله تراشه‌های مورد استفاده در گلو تشکیل بیوفیلم می‌دهند (۳). با توجه به ماهیت چند فاکتوری تشکیل بیوفیلم در /سیتوباکتر بومانی تعدادی از ژن‌ها و محصولات آنها در این فرایند دخیل می‌باشند که در مقالات متعدد این ژن‌ها شامل *OmpA*، پروتئین مرتبط با بیوفیلم Bap (۲۵) و همچنین بتالاکتاماز *per-1* یا *Bla-per1* گزارش شده است که نقش بسیار مهمی در چسبندگی و تشکیل بیوفیلم در /سیتوباکتر بومانی ایفا می‌کنند (۱۰). علاوه بر این طیف گسترده‌ای از ژن‌های بتالاکتاماز (ESBL) که یکی از مهمترین آنها در ارتباط با /سیتوباکتر ژن *Bla-per1* می‌باشد، عامل ایجاد مقاومت به پنیسیلین (penicillins) سفوتاکسیم (cefotaxime) سفیتیوتن (ceftibuten) سفنازیدیم (ceftazidime) و مونوباکتام (monobactam) می‌باشد (۲۴) اما مقاومت به کارباپنم (carbapenem) و سفامایسین (cephamycin) را کاهش می‌دهد. در مطالعات سشی در سال ۲۰۰۴ نشان داده شد که چسبندگی /سیتوباکتر بومانی به سطوح پلاستیکی و سلول‌های اپیتلیال برونش (bronchial epithelial cells) تا حد زیادی وابسته به حضور و بیان *Bla-per1* و پروتئین‌های ناشی از بیان این ژن می‌باشد (۲۰). امروزه محققان در حال جستجوی راه‌حل‌های جدید برای درمان باکتری‌های مقاوم به دارو هستند. یکی از این رویکردها بکارگیری نانوذرات که همواره یکی از زمینه‌های کاربردی نانوبیوتکنولوژی در درمان عفونت‌های میکروبی بوده، می‌باشد (۱۱). از زمان باستان خواص ضد میکروبی نقره شناخته شده است ولی اخیراً به دلیل ساخته شدن نقره به صورت نانو ذرات، سطح تماس و خاصیت ضد میکروبی آن تا بیش از ۹۹ درصد افزایش یافته است (۱۲). نقره در ابعاد بزرگتر فلزی خاصیت واکنش‌دهی کمی دارد، ولی زمانی که به ابعاد کوچکتر در حد نانومتر تبدیل می‌شود، خاصیت میکروبی‌کشی آن افزایش می‌یابد، به همین دلیل

ایمیکاسین 30 μ g، سیپروفلوکساسین به مقدار 5 μ g و پپرسیلین تازوباکتام بود.

تست فنوتیپی و ژنوتیپی تشخیص بیوفیلم: در تست فنوتیپی از روش فریمن و همکاران توسط محیط کشت کونگوردآگار استفاده (۵) و محیط کشت حاوی BHI، آگار، ساکارز و رنگ کونگورد به ترتیب به میزان 37 g/L، 10g/L، 50g/L و 0.8 g/L می‌باشد. سویه های بالینی /اسیتوباکتر بومانی در پلیت حاوی محیط کشت کنگورد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شده و در صورت تشکیل بیوفیلم کلنی‌های مشکی رنگ و در غیر این صورت کلنی‌های قرمز رنگ تشکیل می‌دهند. جهت تست ژنوتیپی، ابتدا محیط کشت TSB حاوی ۲٪ گلوکز تهیه و استریل شد و جهت تهیه سوسپانسیون باکتری، به کدورت نیم مک فارلند رسید. در انتها در یک پلیت ۹۶ خانه به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر از محیط یاد شده و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری اضافه و سپس پلیت ۲۴ ساعت انکوبه شد. ۳ چاهک کنترل منفی (عدم رشد باکتری در نتیجه عدم تشکیل بیوفیلم) و ۳ چاهک کنترل مثبت (رشد باکتری و تشکیل بیوفیلم) در یک پلیت انتخاب و پس از گذشت ۲۴ ساعت برای مطالعه بیوفیلم رنگ آمیزی انجام گردید. ابتدا محیط کشت ها از داخل چاهک ها دور ریخته شده و چاهک ها ۲ بار با بافر PBS با حجم ۲۰۰ میکرولیتر شستشو و پس از شستشوی مرحله قبل و خالی کردن چاهک ها، به چاهک ها ۲۰۰ میکرولیتر متانول مطلق افزوده و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس متانول را دور ریخته و پلیت جهت حذف الکل ثابت شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۱٪ به چاهک ها اضافه کرده و ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و چاهک ها خالی شد. به هر یک از چاهک ها ۲۰۰ میکرولیتر استیک اسید گلاسیال ۳۳٪ افزوده و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه پلیت با دستگاه الیزا ریدر با طول موج ۶۴۰ نانومتر خوانش شد. برای بررسی نتایج از روش Optical density cut-off (ODc) استفاده شد. به منظور

عنوان رتروترانسپوزون‌های (retrotransposon ISCR1) *iscr1* می‌تواند به گونه‌ای در تشکیل ساختار بیوفیلم دارای نقش ایفا کند (۹). از آنجایی که نانوذرات نقره به عنوان نانوذرات فلزی اثرات خوبی روی سویه های مورد آزمایش /اسیتوباکتر دارند، می‌توان از این ماده به شکل گسترده در ضد عفونی کردن محیط و پسماندهای بیمارستانی و همچنین به شکل خوراکی یا تماسی در بدن استفاده کرد. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر نانوذرات نقره بر میزان بیان ژن *Bla-per1* می‌باشد که در استحکام بیوفیلم در سویه های مقاوم به داروی /اسیتوباکتر بومانی نقش دارد.

مواد و روشها

تهیه نانوذرات نقره و جمع آوری ایزوله‌های باکتریایی: نانوذره نقره با اندازه متوسط ۲۰ نانومتر و خلوص ۹۹/۹۹٪ ساخت شرکت آمریکایی US Nano از شرکت برهان خریداری گردید. در این پژوهش طی سال های ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۸، به مدت پنج ماه تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی مشکوک به /اسیتوباکتر از بیمارستان‌های شهر تهران جمع آوری و در محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شد. به منظور تایید تشخیص جنس و گونه /اسیتوباکتر، پس از انتقال نمونه‌ها به محیط آزمایشگاه، هر یک از نمونه‌ها را روی محیط‌های کشت بلاد آگار و مک‌کانکی آگار کشت داده و سپس محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. برای نگهداری طولانی مدت باکتری‌ها، آنها را در محیط کشت مایع حاوی گلیسرول تلقیح و سپس در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تست حساسیت آنتی بیوتیکی: جهت انجام کشت آنتی‌بیوگرام یا تست حساسیت میکروبی از روش استاندارد دیسک دیفیوژن طبق پروتکل (CLSI= Clinical and Laboratory Standard Institute) استفاده و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده (Himedia، هند) شامل ایمی‌پنم، جت‌امایسین، کلیستین به میزان 10 μ g، سفنازیدین،

بررسی، ابتدا انحراف معیار و میانگین OD چاهک‌های کنترل منفی محاسبه و سپس طبق فرمول زیر محاسبه تعیین

(انحراف معیار چاهک‌های کنترل منفی $\times 3$) + میانگین OD چاهک‌های کنترل منفی = ODc

بعدها محاسبه ی ODc، OD چاهک‌های مورد مطالعه به صورت زیر دسته بندی شد.

بیوفیلیم قوی $OD > 4 \times ODc$

بیوفیلیم متوسط $2 \times ODc < OD \leq 4 \times ODc$

بیوفیلیم ضعیف $ODc < OD \leq 2 \times ODc$

بیوفیلیم منفی $OD \leq ODc$

شناسایی مولکولی ژن *Bla-per1* با استفاده از روش

مولکولی PCR: در این تحقیق جهت بررسی مولکولی

حضور ژن *Bla-per1* در نمونه‌ها ابتدا استخراج DNA به

روش Boiling انجام شد. به این ترتیب که از کشت تازه

باکتری‌ها به کمک لوپ یک کلنی برداشته و پس از حل

کردن در میکروتیوپ حاوی ۱ میکرولیتر آب مقطر، در بشر

در حال جوشیدن قرار داده و پس از ۱۵ دقیقه میکروتیوپ سانتریفیوژ شد. مایع رویی در این حالت DNA است.

سپس از پرایمرهای جدول ۲ استفاده و شناسایی مولکولی

ژن *Bla-per1* به روش واکنش PCR در حجم نهائی ۲۰ μL

مطابق جدول ۱ انجام شد. هر نمونه شامل ۹ μL از 2X

Master mix (Ampliqon/ Denmark)، ۲ μL از F Primer

و Primer R، ۳ μL از DNA استخراج شده و ۶ μL آب

تزیق دوبار تقطیر استریل بود. با هر سری آزمایش

PCR یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی در نظر گرفته شد.

برنامه دمایی برای هر دو ژن نیز در جدول ۱ ثبت شد. برنامه

دمایی ۳۲ چرخه ادامه پیدا کرد. محصولات PCR پس از

انجام واکنش روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز و

تائید نهائی شد.

جدول ۱- شرایط واکنش PCR

ساخت پایانی	ساخت	اتصال	واسرشت	واسرشت اولیه	<i>Bla-per1</i>
۷۲	۷۲	۵۵،۵	۹۴	۹۵	دما (°C)
۵ دقیقه	۱ دقیقه	۱ دقیقه	۱ دقیقه	۵ دقیقه	زمان

دستگاه قرائت‌گر الیزا در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانش شد.

بررسی بیان ژن *Bla-per-1* به کمک Real-Time PCR و

آنالیز آماری: استخراج RNA از *اسیتوباکتر بومانی* به

منظور بررسی بیان ژن‌های *Ab-16S-rRNA* و *Bla-per-*

I پس از تیمار با غلظت subMIC نانوذرات نقره توسط

کیت RNX-Plus (شرکت سیناژن، ایران) انجام گرفت.

ساخت cDNA از روی RNA استخراج شده، پس از تعیین

مقدار و غلظت RNA حاصل از سلول‌های بیوفیلیم مثبت

اسیتوباکتر بومانی تیمار شده توسط دستگاه نانودراپ،

مطابق با کیت شرکت یکتا تجهیز آزما (ایران) انجام گرفت.

آزمون میکرودايلوشن برات برای تعیین حداقل غلظت

بازدارندگی (MIC): برای تعیین MIC از روش رقت

گیری سریالی به صورت سه بار تکرار در محیط کشت

انجام شد. رقت ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی لیتر از نانوذره نقره

به چاهک اول پلیت ۹۶ خانه اضافه و پس از پیتاژ رقت

سریالی از آن تا غلظت ۳/۱۲۵ ادامه یافت. سپس ۱۰۰

میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به هرچاهک اضافه و

پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک شب

گرمخانه گذاری شدند. یک چاهک به عنوان بلانک (حاوی

محیط کشت) و چاهک دیگر به عنوان کنترل مثبت (حاوی

محیط کشت و *اسیتوباکتر بومانی* بدون تیمار با نانوذره)

استفاده شد. نهایتاً، کدورت تمام چاهک‌ها با استفاده از

جدول ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده در PCR

ژن هدف	توالی ها	محصول (bp)	دمای اتصال
<i>Bla-per-1</i>	5'-ATGAATGTCATTATAAAAAGC-3' F 5'-TTAATTTGGGCTTAGGGCAGAA-3' R	933	55.5
<i>16S rRNA</i>	F 5'TATCAGGACCATCTGGAGTAGG-3' R 5'-CATCAACTTCACCTCACGC-3'	110	60

نمونه تیمار نشده استاندارد به دست آمد. نسبت ژن هدف به ژن مرجع *16s rRNA* از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد. در این پژوهش محاسبه آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام و نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت بیان ژن‌های هدف، بین نمونه‌های کنترل و تیمار شده با روش آماری Tukey's HSD post-hoc test محاسبه و مرز معناداری روی $P \leq 0.05$ قرار گرفته شد.

نتایج

ایزوله‌های انتخاب شده و نتایج آنتی بیوگرام باکتری، تست فنوتیپی و ژنوتیپی تشخیص بیوفیلم: از ۱۰۰ نمونه جمع آوری شده ۱۲ نمونه /سیتوباکتر بومانی از بیماران بستری به دست آمد که براساس نوع نمونه انتخاب شد که شامل: ۳ نمونه زخم، ۱ نمونه خون، ۴ نمونه پوست و ۲ نمونه ادرار و ۲ نمونه تراشه بود. نتایج حاصل از تست حساسیت میکروبی مطابق جدول ۳ نشان داد که /سیتوباکترهای جداسازی شده به تمام آنتی بیوتیک های ایمی پنم، جنتامایسین، سیپروفلوکسازین، سفنازیدین، ایمیکاسین، پپیرسولین، تازوباکتام مقاوم و نسبت به کلیستین حساس بود. در این مطالعه، از محیط کشت کنگورد آگار برای بررسی فنوتیپی بیوفیلم استفاده شد. باکتری‌های بیوفیلم مثبت کلنی‌های مشکی رنگ تولید کرده در صورتی که باکتری‌های فاقد بیوفیلم به همان حالت اولیه یعنی قرمز رنگ باقی می‌ماند (شکل ۲). از میان ۱۲ سویه بالینی، تمامی سویه ها از نظر تست فنوتیپی بیوفیلم مثبت بودند. سپس تست ژنوتیپی انجام و مطابق با

در این پژوهش برای انجام تست Real-Time PCR از کیت SYBER green یکتا تجهیز آزما (ایران) استفاده و ژن *16s rRNA* به عنوان ژن مرجع (کنترل داخلی) جهت بررسی بیان ژن *Bla-per-1* در باکتری‌های تیمار شده با نانوذرات نقره استفاده شد. طراحی پرایمرهای این تحقیق با نرم افزارهای Primer Express و Gene Runner انجام گرفت. در مرحله بعد به منظور تایید پرایمرها، با استفاده از توالی‌های موجود در بانک‌های ژنی و ابزار آنالیز BLAST، صحت پرایمرها تایید شد. در جدول ۲ توالی جفت پرایمرهای جلوبر و برگشتی دو ژن *Bla-per-1* و *16s rRNA* ثبت شد. طبق پروتکل، مسترمیکس، پرایمرها و cDNA سنتز شده در حجم مناسبی مخلوط شده و توسط دستگاه Corbet Real-time PCR واکنش انجام گردید. حجم واکنش ۱۵ میکرولیتر و شامل cDNA، پرایمر جلوبر و برگشتی برای هر دو ژن *Bla-per-1* و *16s rRNA*، مسترمیکس سایبرگرین و آب مقطر دوبار تقطیر استریل بود. چرخه دمایی شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۶ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ سیکل در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه بود. همچنین از سویه ATCC 25923 /سیتوباکتر بومانی به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. برای هر نمونه، واکنش دو مرتبه انجام گرفته و میانگین مقادیر به دست آمده به عنوان مقدار (کمیت) بیان ژن برای آن نمونه در نظر گرفته شد. از فرمول مرجع نسبی بیان لیواک به روش $\Delta\Delta Ct$ برای تعیین بیان ژن مورد نظر استفاده گردید. $\Delta\Delta Ct$ توسط تفریق ΔCt نمونه تیمار شده با نانوذره نقره از ΔCt

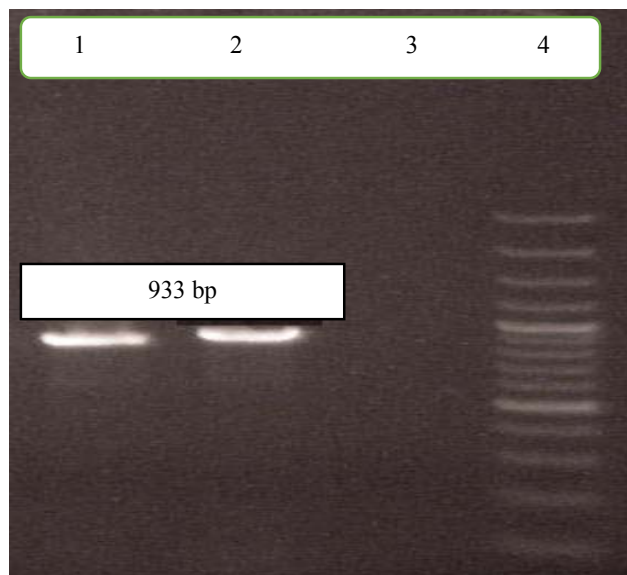
جدول ۳ تعداد ۱۱ سویه از باکتری‌ها دارای بیوفیلم قوی و سویه شماره ۱۸ دارای بیوفیلم متوسط بود.

جدول ۳- نتایج حاصل از تست حساسیت میکروبی و سنجش ژنوتیپی بیوفیلم

Sym/ St	IMI	GEN	CAZ	CIR	AMI	MEN	PTZ	CL	Biofilm
5	R	R	R	S	S	I	R	R	R
9	R	I	R	S	R	R	R	R	R
11	R	R	R	R	R	R	R	R	R
18	I	R	R	S	R	R	I	R	I
24	R	R	R	S	R	R	R	R	R
28	R	R	R	R	R	R	R	R	R
31	R	R	R	R	R	R	R	R	R
33	R	R	R	R	R	R	R	R	R
36	R	R	R	R	R	R	R	R	R
38	R	R	R	R	R	S	R	R	R
40	R	R	R	R	R	R	R	R	R
44	S	I	R	R	S	R	I	S	R
ATCC 25923	I	S	R	I	R	R	I	S	R

باشد. همچنین ارزیابی کمی اثرات ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره با کمک روش حداقل غلظت مهارکنندگی یا MIC انجام گرفت. سویه‌های بیوفیلم مثبت تحت تاثیر غلظت-های ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذرات نقره در مدت زمان ۲۴ ساعت قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سویه‌های مختلف دارای محدوده ای از MIC بودند. نتایج این تست در جدول ۴ ثبت شد.

نتایج تایید استخراج DNA، بررسی مولکولی حضور ژن *Bla-per1* در سویه های *اسیتوباکتر بومانی* و MIC نانوذرات نقره علیه سویه های بیوفیلم مثبت: جهت تایید استخراج DNA و حضور ژن *Bla-per1* در سویه های باکتریایی مورد مطالعه تست مولکولی PCR انجام و نتایج توسط الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. مطابق با نتایج بانده مورد انتظار ۹۳۳ جفت بازی در تمام سویه ها تشخیص داده شد که بیانگر حضور ژن *Bla-per1* می



شکل ۱- الکتروفورز محصول تکثیر شده ی ژن *Bla-per1* در سویه های *اسیتوباکتر بومانی* با PCR. ردیف ۱-۲: محصول تکثیر شده ژن *Bla-per1* با اندازه ی 933bp در سویه استاندارد و سویه بالینی، ردیف ۳: کنترل منفی و ردیف ۴: مارکر 100bp DNA Ladder.

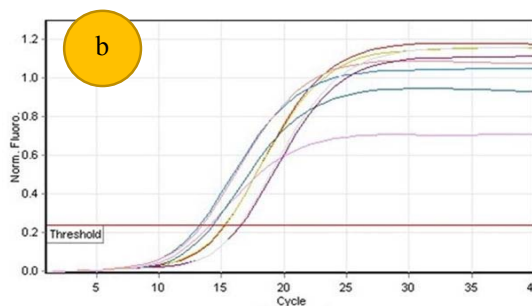
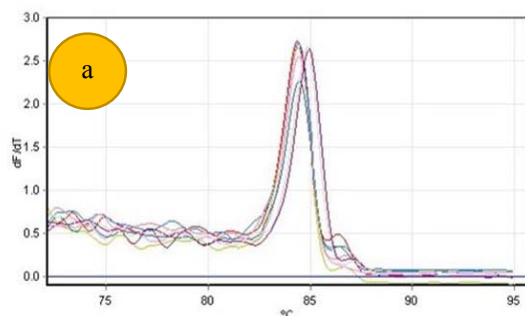
مطابق با جدول ۴ میزان جذب در تمامی سویه‌ها بعد از تیمار با نانوذرات نقره کاهش داشته که نشان دهنده کاهش توانایی تشکیل بیوفیلم سلول‌های باکتریایی و کاهش جذب نوری در نتیجه توانایی کم اتصال به کف میکروپلیت بوده است.

جدول ۴- تعیین MIC نانوذره نقره در سویه‌های مختلف.

Bacterial strain number	MIC concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Light absorption before treatment	Light absorption after treatment	Absorption difference
5	6.25	0.26	0.13	0.13
9	12.5	0.11	0.08	0.03
11	50	0.25	0.18	0.07
18	12.5	0.34	0.17	0.17
24	25	0.26	0.09	0.17
28	12.5	0.44	0.15	0.29
31	6.25	0.38	0.19	0.19
33	3.125	0.52	0.086	0.504
36	25	0.30	0.089	0.211
38	6.25	0.51	0.23	0.28
40	6.25	0.62	0.23	0.39
44	25	0.51	0.16	0.35
ATCC 25923	500	0.48	0.082	0.398

آماري تفاوت معناداري در مقايسه با بيان ژن *16S rRNA* از خود نشان دادند ($P \leq 0.05$). نتايج حاصل از تغيير بيان ژن *Bla-per1* در سویه‌های بیوفیلم مثبت در جدول ۵ ثبت و نمودار حاصل از تکثیر و منحنی ذوب در شکل ۲ نشان داده شد.

نتایج بررسی بیان ژن *Bla-per1* سویه‌های بیوفیلم مثبت در غلظت‌های subMIC از نانوذره توسط روش **Quantitative Real-Time PCR**: نتایج نشان داد که سویه‌های باکتری با دارا بودن MICهای مختلف، تحت تاثیر نانوذرات نقره تغییر بیان مختلفی را داشته و از نظر



شکل ۲ - نمودار حاصل از تکثیر ژن *Bla-per1*. a. نمودار تکثیر ژن *Bla-per1*. b. نمودار منحنی ذوب ژن *Bla-per1* با دمای ۸۴/۹

Real-Time PCR، هر چه میزان CT کمتر میزان بیان بیشتر است. به این ترتیب میزان بیان ژن *Bla-per1* در /سینتوباکتریومانی تیمار نشده با نانوذره نسبت به همان باکتری پس از تیمار با نانوذره نقره بیشتر است. از طرفی مقایسه بیان ژن *Bla-per1* نسبت به ژن مرجع نشان دهنده تغییر میزان بیان این ژن در غلظت‌های زیرحد کشندگی

بر طبق نتایج حاصل از Real-Time PCR تمام سویه‌های باکتریایی تغییر بیان در ژن *Bla-per1* را نشان دادند. در این پژوهش که به صورت ۳ بار تکرار انجام شد مطابق با نتایج ثبت شده در جدول ۵، میانگین CT سویه‌های تیمار نشده با نانوذره نقره در مقایسه با میانگین CT سویه‌های تیمار شده با نانوذره نقره عدد کمتری را نشان داد. بر اساس اصل

نانوذرات نقره می‌باشد. با توجه به نتایج، بیشترین میزان کاهش بیان ژن *bla-per1* در سویه شماره ۱۱ و کمترین میزان کاهش بیان مربوط به سویه شماره ۵ بود. این امر بیانگر مقاومت بیشتر سویه شماره ۵ نسبت به سایر باکتری‌ها به نانوذرات نقره می‌باشد. مکانیسم‌های متفاوت مقاومت به مواد آنتی‌باکتریال، میزان فعالیت بیانی ژن‌های مقاومت و مکانیسم‌های دفاعی دیگر همچون بیوفیلیم عوامل مهم تعیین‌کننده در مقابله با مواد آنتی‌باکتریال می‌باشد. سویه شماره ۵ به علت فعالیت بیشتر مکانیسم‌های مقاومت به مواد آنتی‌باکتریال، میزان بیان کمتری از ژن

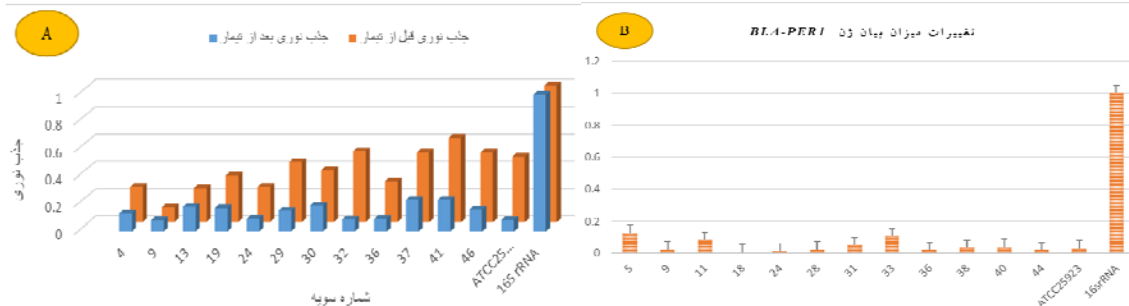
bla-per1 داشته، در صورتی که سویه شماره ۱۱ با بیان بیشتر ژن *bla-per1* نسبت به مبارزه با نانوذرات نقره اقدام نموده است. تفاوت بیان ژن در سویه‌های *اسیتوباکتر بومانی* قبل و پس از تیمار با نانوذرات نقره توسط نرم افزار SPSS آنالیز و روش واریانس یک طرفه انجام و نتایج نشان دهنده ی معنی داری تفاوت بیان در سطح $P \leq 0.05$ بود. نانوذرات نقره با تاثیر مستقیم بر کاهش بیان ژن *bla-per1* می‌توانند مقاومت این باکتری به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها را کاهش دهند.

جدول ۵- نتایج حاصل از تغییر بیان ژن *Bla-per1* در سویه‌های بیوفیلیم مثبت قبل و پس از تیمار با نانوذره در مقایسه با ژن *16srRNA*

Strain Number	Untreated with nanoparticles		Treated with nanoparticles		Altered <i>Bla-per1</i> gene expression	<i>16srRNA</i> gene expression
	Average CT of <i>16srRNA</i>	Average CT of <i>Bla-per1</i>	Average CT of <i>16srRNA</i>	Average CT of <i>Bla-per1</i>		
۵	۱۹/۶	۱۸/۹	۲۰/۱	۲۲/۲۵	۰/۱۲۹	۱
۹	۱۸/۸	۲۰/۸	۱۹/۷	۲۶/۷	۰/۰۲۳	۱
۱۱	۱۹/۵	۱۹/۶۵	۲۰/۲	۲۳/۶	۰/۰۸۵	۱
۱۸	۱۹/۷	۱۹/۷۵	۲۰/۴	۲۷/۲	۰/۰۰۸	۱
۲۴	۱۹	۲۰/۴	۲۰/۳	۲۶/۹۵	۰/۰۱۴	۱
۲۸	۱۹/۳	۲۰/۰۵	۲۰/۱	۲۵/۸	۰/۰۲۵	۱
۳۱	۱۸/۹	۲۰/۵۵	۱۹/۶	۲۵/۲۵	۰/۰۵۱	۱
۳۳	۱۹/۲	۱۸/۶۵	۱۹/۸	۲۲/۳	۰/۱۰۹	۱
۳۶	۱۸/۵	۱۸/۹۵	۲۰/۲	۲۴/۹	۰/۰۲۱	۱
۳۸	۱۹/۸	۱۹/۶	۲۰/۴	۲۴/۷۵	۰/۰۳۷	۱
۴۰	۱۹/۵	۱۹/۶	۲۰/۱	۲۷/۵۶	۰/۰۴۱	۱
۴۴	۱۸/۵	۱۸/۹۵	۲۰/۲	۲۴/۹	۰/۰۲۱	۱
ATCC 25923	۱۹/۴	۲۲/۵	۱۹/۵	۲۷/۹	۰/۰۳۲	۱
ATCC 12228	۱۸/۷	-	۱۹/۹	-	-	۱

تشکیل و استحکام بیوفیلیم در سویه‌های تیمار شده با نانوذره در مقایسه با سویه‌های تیمار نشده به طور چشمگیری کاهش یافت. شکل شماره ۴ تغییر بیان ژن *Bla-per1* را با سطح معنی داری $P \leq 0.05$ نشان می‌دهد.

همچنین مقایسه توانایی تشکیل بیوفیلیم در *اسیتوباکتر بومانی* قبل و پس از تیمار با نانوذرات نقره، نشان دهنده کاهش توانایی تشکیل بیوفیلیم در این باکتری شد. این نتایج تایید کننده رابطه بین استحکام بیوفیلیم/*اسیتوباکتر بومانی* و میزان بیان ژن *Bla-per1* بود به طوری که میزان توانایی



شکل ۳- میزان بیان ژن *Bla-per1* در سویه های *اسیتوباکتر بومانی*. A. مقایسه جذب نوری سویه های تیمار شده با نانوذرات نقره با سویه های تیمار نشده. B. کاهش معنا دار میزان بیان ژن *Bla-per1* در سویه های تیمار شده با نانوذرات نقره نسبت به ژن کنترل.

میزان شیوع ژن های *BlaIMP* و *BlaVIM* در سویه های سودوموناس آئیوجینوزا مقاوم به چندین دارو را در مراکز درمانی اصفهان مورد مطالعه قرار دادند و نتایج حاصل از این گروه نتایج نشان می دهد که اغلب نمونه ها مقاوم به دارو هستند و در میان سویه های تولید کننده *ESBL* فراوانی ژن های بتالاکتاماز *BlaIMP* بیشتر از ژن *BlaVIM* بوده است. لذا اندازه گیری سریع و بررسی دقیق مقاومت آنتی بیوتیکی امری ضروری می باشد زیرا فراوانی سویه های تولیدکننده ژن بتالاکتاماز در سویه های بیمارستانی رو به افزایش است (۷).

می توان گفت محققین بسیاری وجود داشته اند که علاقه به بررسی مقاومت *اسیتوباکتر بومانی* به آنتی بیوتیک های مختلف بوده اند. لیهائو کی و همکارانش در سال ۲۰۱۶ میلادی مطالعه ای مبنی بر ارتباط بین مقاومت آنتی بیوتیکی، تشکیل بیوفیلم و مقاومت ویژه ی بیوفیلم در *اسیتوباکتر بومانی* انجام دادند. در مطالعه آنها ارتباط بین مقاومت آنتی بیوتیکی، تشکیل بیوفیلم و مقاومت ویژه ی بیوفیلم در ایزوله های بالینی *اسیتوباکتر بومانی* بررسی گردید (۱۴).

مجتبی ساده و همکارانش در سال ۱۳۹۲ شمسی مطالعه ای با عنوان بررسی ژن های بتالاکتاماز (*BlaTEM*, *blaCTX*) مقاوم به دارو و گلو تار آلدئید در ایزوله های *اسیتوباکتر بومانی* انجام دادند. دستاورد آنها نشان داد که علاوه بر تنوع و شیوع ژن های *BlaCTX*, *BlaTEM* مکانیسم های

بحث و نتیجه گیری

اسیتوباکتر بومانی شایع ترین عامل بیماری زای انسانی در جنس *اسیتوباکتر* می باشد و به عنوان یکی از مهمترین عوامل عفونت های بیمارستانی به شمار می آید. یکی از مشکلات عمده در درمان و پیش گیری از عفونت های ایجاد شده توسط *اسیتوباکتر بومانی*، مقاومت های آنتی بیوتیکی ایجاد شده در آن می باشد و کاربایتم ها به آخرین خط درمان در عفونت های ناشی از باکتری های گرم منفی، از جمله *اسیتوباکتر بومانی* می باشند. اصلی ترین عامل مقاومت به کاربایتم را می توان تولید بیوفیلم دانست (۶). در خصوص مقاومت *اسیتوباکتر* مطالعات زیادی صورت گرفته که نتایج آن ها برحسب زمان و مکان متفاوت بوده است. بنابراین از اهداف مهم این تحقیق، بررسی میزان تشکیل بیوفیلم در سویه های بالینی *اسیتوباکتر بومانی* مقام به آنتی بیوتیک بوده است. پژوهش بروی توانایی اتصال، تشکیل بیوفیلم و ژن های مداخله گر در تشکیل بیوفیلم در سویه های مختلف *اسیتوباکتر بومانی* می تواند اطلاعات امیدوارکننده ای در مورد درک بهتر روند پیچیده ایجاد بیوفیلم و عفونت های ناشی از این ارگانیسم ها فراهم نماید. در سال های اخیر به دنبال مقاومت و ایجاد پایداری باکتری ها به آنتی بیوتیک ها، دلیل مناسبی برای تحقیق در خصوص ژن های بیان کننده بیوفیلم مثل (*Bla-per1*) در باکتری های مختلف بوده است. لادن رحیم زاده ترابی و همکاران در سال ۱۳۹۵

توانایی فوق‌العاده‌ی نقره به عنوان عامل ضد میکروبی سبب استفاده از نانوذرات این ماده در تحقیقات بسیاری از محققان بوده است. تحقیقات مختلفی نشان دادند که نانوذرات توانایی چشمگیری در مهار بیماری‌های عفونی باکتریایی دارند. طبق تحقیقات هندپانی و همکاران در سال ۲۰۱۵ میلادی در خصوص سنتز نانوذرات نقره و اثرات سینرژیک آن‌ها در ترکیب با ایمی‌پنم و دو بیوساید (کشنده‌ی زیستی) علیه بیوفیلم تشکیل شده توسط *اسیتوباکتریومانی*، اثرات نانوذرات نقره به تنهایی و در ترکیب با بیوسایدها و ایمی‌پنم بر ضد بیوفیلم‌های *اسیتوباکتریومانی* و فرم پلانکتونی آن بررسی شد. نتیجه و دستاورد تحقیق این گروه بیانگر این نکته بود که نانوذرات نقره به تنهایی می‌توانند سبب مهار تشکیل بیوفیلم شوند اما اثر آنها در ترکیب با ایمی‌پنم بر ضد اشکال بیوفیلم‌ها و شکل پلانکتونی *اسیتوباکتریومانی* موثرتر است (۳). هندپانی و همکاران در سال ۱۳۹۱ مطالعه‌ای در خصوص مقایسه فعالیت ضد بیوفیلمی نانو ذره نقره و چند ترکیب ضد میکروبی دیگر علیه سویه‌های *اسیتوباکتر مولد بیوفیلم* انجام دادند. نتایج مطالعه‌ی اخیر این بود که استفاده از ترکیبات دارویی با طیف وسیع‌تر مانند نانوذرات نقره در ترکیب با مواد ضد میکروبی مناسب می‌تواند باعث کاهش تشکیل بیوفیلم و حذف بیوفیلم‌های بالغ، کاهش دوز موثر داروها، افزایش کارایی درمان و جلوگیری از تشکیل سویه‌های مقاوم شود (۲۲).

جیان لوئیچی و همکاران در سال ۲۰۱۵ میلادی مطالعه‌ای با عنوان نانوذرات نقره به عنوان عوامل ضد باکتریایی انجام دادند. این گروه در این مقاله تلاش‌های جدید را برای مشخص کردن چالش‌ها و راه‌حل‌های اخیر در درمان بیماری‌های عفونی بویژه کاربرد نانونقره‌ی آنتی‌میکروبیال به صورت خلاصه ارائه کرده و نشان دادند که نانوذرات نقرات باعث کاهش رشد عوامل میکروبی می‌شوند (۹).

متعددی شامل پورین‌ها و *Efflux pump* در ایجاد مقاومت‌های *اسیتوباکتریومانی* نسبت به مواد ضد میکروبی نقش دارند (۸).

ریچا سینگ و همکارانش در سال ۲۰۱۶ میلادی مطالعه‌ای مبنی بر نانوذرات برای کنترل عفونت ناشی از بیوفیلم گونه‌های *اسیتوباکتر* انجام دادند. در گزارش آنها به اهمیت نقش نانوذرات مختلف به عنوان عوامل ضد بیوفیلمی در *اسیتوباکتر*، مواد پوشاننده‌ی سطح برای کنترل و درمان بیوفیلم‌های *اسیتوباکتر* پرداخته شد و نتیجه‌ی مثبت تاثیر نانوذرات بر کاهش تولید بیوفیلم را گزارش نمودند (۱۸).

اسلامی و همکاران در سال ۱۳۹۰ شمسی الگوی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *اسیتوباکتر* جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان آراد تهران را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج مطالعه‌ی این گروه نشان از افزایش مقاومت سویه‌های *اسیتوباکتر* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و آمیکاسین بود که علت آن را به مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها نسبت دادند (۱).

محققان دیگری در صدد بودند تا تاثیر بیوفیلم را در ثبات و بقای باکتری در محیط بخصوص در بیمارستان‌ها (که عاملی برای ایجاد عفونت‌های بیمارستانی است) را نشان دهند. ویدال و همکارانش در سال ۱۹۹۶ میلادی در خصوص ساختار بیوفیلم ثابت نمودند که در *اسیتوباکتریومانی* سلول‌های چسبنده‌ای که با روکش‌های گوناگونی پوشیده می‌شوند، به شکل حدواسط در شرایط کمبود مواد غذایی ساختار بیوفیلم تشکیل داده و به پایدار آن کمک می‌کنند. یافته‌ها حاکی از افزایش سریع در شمار و تعداد سلول‌های بیوفیلم و افزایش نسبی در شمار سلول‌های حاوی مقاومت وجود دارد. این تحقیق ثابت کرد که وجود بیوفیلم در *اسیتوباکتر بومانی* از این میکروارگانیسم در برابر فاکتورهای گوناگون ضد باکتریایی محافظت می‌کند (۲۱).

به طوری که میزان توانایی تشکیل و استحکام بیوفیلم در سویه‌های تیمار شده با نانوذره در مقایسه با سویه‌های تیمار نشده به طور چشمگیری کاهش یافت. بنابراین نانوذرات نقره می‌تواند به عنوان داروی مناسب آنتی-باکتریال مطرح و جهت نگه داری مواد غذایی جایگزین مواد شیمیایی و مضر گردد. از طرفی با توجه به اهمیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مطالعه سایر ژن‌های ویروالانس مرتبط با بیوفیلم مانند *Tat* و *Sec*، *Tol*، *Vir*، *Csu* و ارتباط آن با تشکیل بیوفیلم پیشنهاد می‌گردد. از آنجایی که نانوذرات نقره به عنوان نانوذرات فلزی اثرات خوبی روی سویه‌های مورد آزمایش *اسیتوباکتریومانی* دارند می‌توان از این ماده به شکل گسترده در ضدعفونی کردن محیط و پسماندهای بیمارستانی و همچنین به شکل خوراکی یا تماسی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه مسئولین محترم بیمارستان های شهر تهران به خصوص شریعتی، همچنین جناب آقای حسینی، مسئول آزمایشگاه میکروبی دانشگاه علوم دارویی، که ما را در انجام این پروژه یاری فرمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

نتایج این مطالعه بیانگر این است که نانوذرات نقره روی بیان ژن *Bla-per1* بیوفیلم در *اسیتوباکتریومانی* تاثیر داشته و باعث کاهش بیان این ژن می‌گردد. کاهش بیان ژن باعث عملکرد ضعیف بیوفیلم شده و در واقع بیوفیلم تولید شده در مقایسه با سویه‌های غیرتیمار شده با نانوذره نقره داری بیان ژن *Bla-per1* ضعیف‌تر بوده و استحکام کمتری دارد. همچنین از میزان مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر مواد ضدعفونی کننده و دارویی کاسته شد. مکانیسم های متفاوت مقاومت به مواد آنتی‌باکتریال، میزان فعالیت بیانی ژن‌های مقاومت و مکانیسم‌های دفاعی دیگر همچون بیوفیلم و افلاکس پمپ‌ها عوامل مهم تعیین کننده در مقابله با مواد آنتی‌باکتریال می‌باشد. تفاوت بیان ژن در سویه‌های *اسیتوباکتریومانی* قبل و پس از تیمار با نانوذرات نقره توسط نرم افزار SPSS و روش واریانس یک طرفه انجام و نتایج نشان دهنده‌ی معنی‌داری تفاوت بیان در سطح $P \leq 0.05$ بود. نانوذرات نقره با تاثیر مستقیم بر کاهش بیان ژن *Bla-per1* می‌توانند مقاومت این باکتری به انواع آنتی-بیوتیک‌ها را کاهش دهند. همچنین مقایسه توانایی تشکیل بیوفیلم در *اسیتوباکتریومانی* قبل و پس از تیمار با نانوذرات نقره، نشان دهنده کاهش توانایی تشکیل بیوفیلم در این باکتری بود. این نتایج تاییدکننده رابطه بین استحکام بیوفیلم *اسیتوباکتریومانی* و میزان بیان ژن *Bla-per1* بود؛

منابع

- 1- Azizi O, Shahcheraghi F, Salimizand H, Modarresi F, Shakibaie MR, Mansouri Sh, Ramazanzadeh R, Badmasti F, Nikbin V. Molecular Analysis and Expression of *bap* Gene in Biofilm-Forming Multi-Drug-Resistant *Acinetobacterbaumannii*. 2016; 1(5): 68-74.
- 2- Badmasti F, Siadat SD, Bouzari S, Ajdary S, Shahcheraghi F. Molecular detection of genes related to biofilm formation in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical settings. *Journal of medical microbiology*. 2015;64(5): 64-559.
- 3- Eslami K, Mola abbaszade H, Hamidi M, Bahman abadi R. Antibiotic resistance pattern in *Acinetobacter* strains isolated from clinical specimens of tehran arad hospital. 2013; 19(64): 1-5.
- 4- Hendiani S; Ahya Abdi A; Mohammadi P; Kharrazi Sh. Synthesis of silver nanoparticles and its synergistic effects in combination with imipenem and two biocides against biofilm producing *Acinetobacterbaumannii*. 2015; 2(3): 291-298.
- 5- Hendiani S. Comparison of two methods for quantification of *Acinetobacterbaumannii* biofilm formation. 2014; 2(8): 51-56.
- 6- Jalali M, Rasuli I, Jahangiri A, Jalali nadushan M, Alipoor SH. Immunogenicity of amino acid

- Region 7601-8140 in Biofilm associated protein of *Acinetobacterbaumannii*. 2014; 4(16): 15-26.
- 7- Rahimzadeh Torabi L ,Doudi M ,Golshani Z . The frequency of blaIMP and blaVIM carbapenemase genes in clinical Isolates of *pseudomonas aeruginosa* in Isfahan medical centers. Vol. 59, No. 3 P: 139-147.
 - 8- Sadeh M, Goodarzi H. blaTEM , blaCTX gene expression in isolates of antibiotic-resistant *Acinetobacter Baumanni*.2012;4:232-238.
 - 9- 9. Allaher TK, Wu S, Webster P, Aguilera R. Identification of biofilm proteins in non-typeable *Haemophilus influenzae*. BMC microbiology. 2006;6(1):65.
 - 10- Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nature reviews microbiology. 2007;5(12):939.
 - 11- Donelli G., Vuotto C. Biofilm-based infections in long term care facilities. Future Microbiol.2014; 9: 175-188.
 - 12- Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacterspp.* an overview. Microbes Environ 2011; 26: 12-101.
 - 13- Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M , Morelli G and Galdiero M . Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. 2015; 20: 8856-8874.
 - 14- Fishbain J, Peleg A. Treatment of *Acinetobacter* Infections. 2010; 51(1): 79-84 .
 - 15- Humberto H, L., Garza-Treviño, E, N., Ixtapan-Turrent, L., Singh, D, K. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. J Nanobiotechnology 2011; 9(30): 1-8.
 - 16- Hwang E, T., Lee, J, H., Chae, Y, J., Kim, Y, S., Kim, B, C., Sang, B.Gu, M, B. Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria. Small. 2008; 4(6): 50-746.
 - 17- Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. New Microbiol. 2014;37(2): 27-119.
 - 18- Lihua Qi, Hao Li, Zhang C, Liang B, Jie L, Wang L, Xinying Du, Liu X, Qiu S and Song H. Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistance in *Acinetobacterbaumannii*. 2016; 10: 483.
 - 19- Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. New England Journal of Medicine. 2008;358(12): 81-1271.
 - 20- Sechi LA, Karadenizli A, Deriu A, Zanetti S, Kolayli F, Balikci E, et al. PER-1 type beta-lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. Medical science monitor. 2004;10(6): BR4-BR180.
 - 21- Singh R, Nadhe Sh, Wadhvani S, Shedbalkar U and Chopade BA. Nanoparticles for Control of Biofilms of *Acinetobacter* Species. 2016; 9: 383.
 - 22- Vidal R, Dominguez M, Urrutia H, Bello H. Biofilm formation by *Acinetobacterbaumannii*. 1996; 86:49-58.
 - 23- Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. Archives of pathology & laboratory medicine. 2007;131(1):18-43.
 - 24- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? Clinical microbiology reviews. 2005;18(2): 25-306.
 - 25- Piri gharaghie T, Sadat shandiz s A. The inhibitory effects of silver nanoparticles on BAP gene expression in antibiotic-resistant *Acinetobacter bumanni* isolates using Real time PCR. SJIMU.2018;26(4)175-185.

Evaluation of silver nanoparticles on the expression of *Bla-per1* gene effective in biofilm strength in antibiotic-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*, using Quantitative Real-Time PCR

Piri Gharaghie T.¹, Sadat Shandiz S.A.^{2*} and beiranvand Sh.¹

¹ Dept. of Biotechnology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, I.R. of Iran

² Dept. of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Acinetobacter baumannii is a major cause of severe nosocomial infections due to increased antibiotic resistance and virulence. The ability of *Acinetobacter baumannii* to form a biofilm helps it survive in adverse environmental conditions, including the hospital environment and medical equipment. The aim of this study was to investigate the effects of silver nanoparticles on the biofilm strength of antibiotic-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. After isolation and differential diagnosis of 100 clinical specimens of *Acinetobacter baumannii*, microbial resistance was determined by antibiogram method and biofilm-forming strains were identified by phenotypic and genotypic tests. The minimum inhibitory concentration of strains against commercial silver nanoparticles was determined and *Bla-per1* gene expression of resistant strains treated with SubMIC concentration of silver nanoparticles was determined by Quantitative Real-Time PCR. 12 isolated samples of *Acinetobacter baumannii* bacteria were resistant to all studied antibiotics except Cloistin and formed a strong biofilm structure. Molecular PCR analysis confirmed the presence of *Bla-per1* gene in resistant strains. Treatment of strains with SubMIC concentration of silver nanoparticles showed an acceptable reduction in *Bla-per1* gene expression at a significant level of $P \leq 0.05$. Silver nanoparticles have significant biological effects on reducing the virulence and expression of resistance genes and the formation of *Acinetobacter baumannii* biofilm, so they can be considered as drug candidates.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, Silver nanoparticle, Biofilm, *Bla-per1*