

Synergistic effect of copper oxide nanoparticles and chloramphenicol antibiotic on MexA gene expression of pump efflux system in drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates

Faten Alazavi ¹, Farahnaz Molavi^{2*}, Maryam Tehranipoor ²

¹Master's Student of Cellular and Molecular Sciences, Department of Biology, Faculty of Science, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

²Department of Biology, Faculty of Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 8 Sep 2021

Accepted: 22 Jan 2022

ePublished: 31 May 2022

Keywords:

MexAB-OprM,
Pseudomonas,
Copper oxide nanoparticles,
Antibiotic, Iran

Abstract

Background. *Pseudomonas aeruginosa* is a causative agent of nosocomial infections. Chloramphenicol is a broad-spectrum, inexpensive, and common antibiotic. MexAB-OprM is a secretory pump that causes the innate resistance of this bacterium. This study aimed to evaluate the expression of MexA gene under the treatment of copper nanoparticles and chloramphenicol.

Methods. In this study, 49 samples were collected from 11 laboratories in Mashhad, Iran. Abundance of Me gene MexA was done by polymerase chain reaction (PCR) method, and antibiotic susceptibility assessment was performed by disk diffusion method. To calculate minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC), copper nanoparticles, and a combination of both, the broth dilution method was performed. Microdilution method and real time PCR technique were used to determine the effective dilution of copper oxide nanoparticles and chloramphenicol antibiotics and expression of MexA gene, respectively.

Result. The identity of 49 strains was confirmed. All strains had the MexA gene and were resistant to more than two antibiotics. The MIC of bacterial strains was 250 µg/ml for copper oxide nanoparticles and 62.50 µg/ml for chloramphenicol antibiotic. Compared to antibiotics, copper nanoparticles had a greater effect on MIC, though it was lower than the combined effect of antibiotics and copper oxide nanoparticles.

Conclusion. Copper oxide nanoparticles or the synergistic effect of copper oxide nanoparticles and chloramphenicol antibiotics are effective in reducing MexA gene expression.

Practical Implications. Nanoparticles are an important option for use as an alternative to or supplement to antibiotics. Also, copper oxide nanoparticles are more effective to inhibit bacterial growth when used in combination with antibiotics.

How to cite this article: Alazavi F, Molavi F, Tehranipoor M. Synergistic effect of copper oxide nanoparticles and chloramphenicol antibiotic on MexA gene expression of pump efflux system in drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2022; 44(2):127-138. doi: 10.34172/mj.2022.022. Persian.

*Corresponding author's Email: Farahmolavi@gmail.com

© 2022 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Extended Abstract

Background

Pseudomonas aeruginosa is one of the causative agents of nosocomial infections in the intensive care unit (ICU), and it is a major problem in controlling nosocomial infections due to its resistance to various antibiotics. Chloramphenicol is a broad-spectrum, inexpensive, and common antibiotic in most countries. In recent years, nanoparticles have become one of the alternatives that can replace or supplement antibiotics. MexAB-OprM is a secretory pump found in all isolates of *P. aeruginosa* and causes the innate resistance of these bacteria to a variety of antibiotics. The aim of this study was to evaluate the expression level of MexA gene in samples of resistant *P. aeruginosa* treated with copper nanoparticles and chloramphenicol.

Methods

In a cross-sectional descriptive study, 49 samples were collected and identified from 11 laboratories in Mashhad, Iran. To identify the collected *P. aeruginosa* samples, we used different biochemical tests, including growth in McConkey agar medium, SIM (Sulfide Indole Motility), MB (Eosin Methylene Blue), oxidase test, catalase, urease, reaction in TSI medium (Triple Sugar Iron), OF test, mobility test, growth in streamide agar medium (Simon citrate agar), and growth at 42 °C Hinton agar. Antibiotic susceptibility of bacteria was obtained according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines in 2018.

The discs of amoxicillin-clonic acid (30 µg), gentamicin (10 µg), clindamycin (10 µg), imipenem (10 µg), tetracycline (5 µg), ceftazidime (30 µg), chloramphenicol (10 µg), erythromycin (15 µg), and sulfamethoxazole (30 µg) were used. To ensure the presence of the gene in strains with multidrug resistance, DNA extraction was performed using a DNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Copper nanoparticle powder (ARMINANO brand) was purchased from Armina Ebtekar Sustainable Engineering Company. To prepare a dilution series of copper oxide nanoparticles, a dilution series of

62.5 1000, 500, 250, 125, and 31.25 µg/ml was prepared. Dilutions of chloramphenicol antibiotics were performed according to the CLSI table by the serial dilution method, and then diluted in a ratio of 1: 100 in culture medium. Finally, according to the standard method of the National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS), the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by dilution broth method to determine the antimicrobial effect of copper oxide nanoparticles and chloramphenicol. After treatment with inhibitors, real time polymerase chain reaction (PCR) technique was used to determine the effect of copper oxide nanoparticles and chloramphenicol antibiotics and expression of MexA gene on its causative bacteria.

Results

All the samples collected from 11 medical diagnostic laboratories in Mashhad were confirmed as *P. aeruginosa*. Antibiotic susceptibility testing was performed for resistant strains of *P. aeruginosa*. Diagnosis was performed according to CLSI standard and the results were reported as sensitive (S), semi-sensitive (IM), and resistant (R). Moreover, all strains were resistant to more than two antibiotics, and 11 strains showed resistance to chloramphenicol. The PCR was performed on 49 *P. aeruginosa* strains. Amplification of the MexA efflux pump gene in bacterial strains showed the presence of a 500 bp band in gel electrophoresis. Strains containing the desired gene were considered as positive control. The results of molecular analysis of the strains showed that all strains had the desired gene. The results showed that the MIC of bacterial strains was 250 µg/ml for copper oxide nanoparticles and 62.50 µg/ml for chloramphenicol antibiotic. To compare the effect of copper oxide and chloramphenicol nanoparticles on MexA gene expression, gene expression was evaluated in two groups treated with copper oxide nanoparticles and chloramphenicol nanoparticles and untreated samples using melting curve analysis and the amplification curve. The expression of MexA gene in

the treated strains showed a change compared to the control sample. According to the results of MexA gene expression, the *P*-value for MexA gene was less than 0.05, indicating a significant difference between the two groups.

Conclusion

Recent studies have indicated an increase in the prevalence of antibiotic resistance among *P. aeruginosa* strains. Antibiotic resistance is a serious problem for the treatment of *P. aeruginosa* infections

in the hospital. According to the results of present study, copper oxide nanoparticles can be considered as an option for controlling infections caused by *P. aeruginosa*. Also, due to the chromosomal presence of MexAB-OprM efflux genes in *P. aeruginosa* samples, the gene components of this system can be used as diagnostic tools in the molecular identification of drug-resistant *P. aeruginosa*.

اثر هم افزای نانوذره اکسید مس و آنتی بیوتیک کلرامفنیکل بر بیان ژن MexA سیستم افلاکس پمپ در جدایه های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به دارو

فاتن العزای^۱، فرحناز مولوی^{۲*}، مریم طهرانی پور^۲

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد رشته علوم سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
^۲ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۰/۶/۱۷
پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲
انتشار برخط: ۱۴۰۱/۳/۱۰

کلیدواژه ها:

پمپ افلاکس، سودوموناس،
نانوذرات اکسید مس،
آنتی بیوتیک، ایران

چکیده

زمینه. سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل عفونت های بیمارستانی است. کلرامفنیکل آنتی بیوتیکی وسیع الطیف، ارزان و رایج است. MexAB-OprM یک پمپ ترشحی است که موجب مقاومت ذاتی این باکتری می شود. هدف این پژوهش ارزیابی بیان ژن MexA تحت تیمار نانوذره اکسید مس و کلرامفنیکل است.

روش کار. تعداد ۴۹ نمونه از ۱۱ آزمایشگاه سطح شهر مشهد جمع آوری و تعیین هویت شدند. فراوانی ژن MexA به روش PCR بررسی شد. ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی، با روش انتشار دیسک انجام شد. برای MIC و MBC آنتی بیوتیک، نانوذرات مس و ترکیب هردو، روش رقت در برات انجام شد. از روش میکرو دیالوژن و تکنیک Real time-PCR به ترتیب برای تعیین رقت اثر بخش نانوذره اکسید مس و آنتی بیوتیک کلرامفنیکل و بیان ژن MexA استفاده شد.

یافته ها. هویت ۴۹ سویه تایید شد. تمام سویه ها واجد ژن MexA بوده و به بیش از دو آنتی بیوتیک مقاوم بودند. حداقل غلظت مهار رشد سویه های باکتری برای نانوذرات اکسید مس ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر و برای آنتی بیوتیک کلرامفنیکل ۶۲/۵۰ میکروگرم در میلی لیتر بود. نانوذرات اکسید مس در مقایسه با آنتی بیوتیک تاثیر بیشتری در مهار رشد باکتری داشت و میزان این تاثیر نسبت به اثر ترکیبی آنتی بیوتیک و نانوذرات اکسید مس کمتر است.

نتیجه گیری. نانوذرات اکسید مس و یا اثر هم افزای نانوذرات اکسید مس و آنتی بیوتیک کلرامفنیکل در کاهش بیان ژن MexA موثر هستند.

پیامدهای عملی. نانوذرات گزینه مهمی برای استفاده به عنوان جایگزین یا مکمل آنتی بیوتیک ها هستند و نانوذرات اکسید مس زمانی که همراه با آنتی بیوتیک مصرف شوند تاثیر بیشتری در مهار رشد باکتری دارند.

مقدمه

تضعیف شده است، می گردد. در حال حاضر سودوموناس آئروژینوزا به گروه های مختلفی از آنتی بیوتیک ها مقاوم بوده و به همین دلیل مسبب مرگ و میر در بیمارستان ها به خصوص در بخش مراقبت ویژه است. در واقع این باکتری سومین عامل عفونت بیمارستانی بعد از استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی است. مطالعات گسترده ای که در خصوص مقاومت این باکتری انجام شده نشان می دهد که مقاومت ذاتی بالایی به پنی سیلین و اکثر آنتی بیوتیک های گروه بتا لاکتام در این باکتری وجود دارد. به نظر می رسد قدرت بالای زنده ماندن باکتری در محیط و انتقال آن به بیماران توسط عوامل مختلف، مهم ترین عامل شیوع این

سودوموناس آئروژینوزا یک باسیل گرم منفی، متحرک، اکسیداز مثبت با یک تا سه تائوک قطبی است. این باکتری به جز مواقعی که در حضور نیترات رشد می کند، در شرایط دیگر یک باکتری هوازی اجباری است. این ارگانیزم روی اکثر محیط های کشت آزمایشگاهی رشد می کند. سودوموناس آئروژینوزا موجب عفونت مجاری ادراری، سیستم تنفسی، التهاب پوست، عفونت های بافت نرم، باکتری می (وجود باکتری در خون)، عفونت های استخوان و مفاصل، عفونت های معده و روده ای و عفونت در بیماران مبتلا به سرطان و ایدز که سیستم ایمنی آنها

* نویسنده مسؤول: ایمیل Farahmolavi@gmail.com

حق تالیف برای مولفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

سانتی‌گراد هیتون اگر استفاده شد. چهار نمونه در محیط کشت تجاری LB Broth حاوی ۲۰ درصد گلیسرول در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه استاندارد استفاده شده در این تحقیق *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 بود که به صورت لیوفیلیزه خریداری شد.^۳

تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی (تست آنتی‌بیوگرام)

جهت انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی، کلنی‌های سودوموناس آئروژینوزای حل شده در محیط نوترینت برات با استاندارد نیم مک‌فارلند سنجیده شد و زمانی که کلنی‌ها به کدورت استاندارد رسیدند، سویه‌ها روی محیط مولر هیتون اگر کشت داده شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از شرکت پادتن طب خریداری شد. دیسک‌ها با روش دیسک دیفیوژن توسط سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 کنترل کیفی شده و پس از تایید قطر هاله‌های به دست آمده، مطابق با استاندارد CLSI 2018 از این دیسک‌ها برای سویه‌های مورد مطالعه استفاده شد.

در نهایت قطر هاله عدم رشد بررسی شده و میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها مطابق با روش (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI 2018) اندازه‌گیری شد.^۲ در این مطالعه از دیسک‌های آموکسی‌سیلین/کلاونیک اسید (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، کلیندامایسین (۱۰ میکروگرم)، ایمپنم (۱۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۵ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۱۰ میکروگرم)، سفازولین (۱۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم) و سولفامتوکسازول (۳۰ میکروگرم) استفاده شد. بعد از تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی، سویه‌های دارای مقاومت چند دارویی انتخاب شده و برای ادامه مطالعه استفاده شدند.

استخراج DNA و شناسایی ژن *MexA* پمپ افلاکس توسط تکنیک PCR:

برای اطمینان از وجود ژن مورد نظر در سویه‌های دارای مقاومت چند دارویی، استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج (کیژن، هیلدن، آلمان) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. واکنش PCR برای تکثیر ژن *MexA* باحجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲ میکرولیتر (ایران، سیناکلون) PCR master mix 5X دارای Taq DNA polymerase ۵ واحد در میکرولیتر ۲/۵، ۳MgCl₂ ۲/۵ mM، dNTPs ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها، ۵ میکرولیتر از DNA الگو و ۶ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) با برنامه

عفونت در بیمارستان‌ها باشد.^۱ آنتی‌بیوتیک‌ها جزو داروهایی هستند که در طب مدرن برای درمان بیماری‌ها استفاده می‌شوند ولی مقاومت ذاتی این باکتری به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها مشکلات جدی برای استفاده از آنها ایجاد کرده است. از طرف دیگر در سال‌های اخیر توجه عمومی به سمت نانوذرات به عنوان مواد جایگزین یا مکمل آنتی‌بیوتیک، به سرعت در حال گسترش است. در واقع فناوری نانو به صورت روزافزون در سطح جهانی استفاده می‌شود و برای کاهش عفونت‌های میکروبی پوست و زخم‌های پوستی در ابزارهای مختلفی مانند پروتزها یا چسب زخم‌ها کاربرد دارد.^۲ نتایج گذشته نشان داده است که نانوذرات مس در کشتن طیفی وسیع از باکتری‌ها که در عفونت‌های بیمارستانی دخالت دارند موثر است و فعالیت ضد میکروبی بهینه نانوذرات اکسید مس قبلاً ثابت شده است.^۳ فعالیت ضد میکروبی نانوذرات در برابر باکتری‌ها معمولاً با دو مکانیسم اتفاق می‌افتد، (۱) نانوذرات با اتصال به غشای باکتری در نفوذپذیری و مکانیسم تنفس اختلالات گسترده ایجاد می‌کنند و (۲) نانوذرات می‌توانند به داخل باکتری نفوذ کنند و با ترکیبات حاوی گوگرد و فسفر واکنش دهند.^۲ کلرامفنیکل یک آنتی‌بیوتیک ارزان‌قیمت با مصرف گسترده است و سیستم‌های افلاکس پمپ در مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف نقش مهمی دارند.^۳ در این تحقیق اثر هم‌افزای نانوذرات مس با کلرامفنیکل بر بیان ژن *MexA* - که یکی از اجزای مهم عوامل مقاومت در سودوموناس آئروژینوزا است - بررسی شد.

روش کار

شناسایی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

این مطالعه به صورت تحلیلی-مقطعی در یک بازه زمانی ۹ ماهه (۱۳۹۸-۱۳۹۹) انجام شد. ۴۹ جدایه باکتریایی سودوموناس آئروژینوزا از ۱۱ آزمایشگاه تشخیص طبی در شهر مشهد جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد منتقل شدند. ابتدا نمونه‌ها در محیط کشت مولر هیتون اگر کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس جهت شناسایی سودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری شده، در کنار رنگ‌آمیزی گرم، از تست‌های بیوشیمیایی مختلف شامل رشد در محیط مک‌کانکی آگار، (Eosin Methylene Blue) MB، (Sulfide Indole Motility) SIM، تست اکسیداز، کاتالاز، اوره‌آز، واکنش در محیط TSI (Triple Sugar Iron)، تست OF، بررسی تحرک، رشد در محیط ستریماپد آگار (سیمون سیترات آگار) و رشد در دمای ۴۲ درجه

آزمایشگاه بالینی، حداقل غلظت ممانعت کننده رشد برای تعیین اثر ضد میکروبی نانوذره اکسید مس و کلرامفنیکل، با روش برات دایلوژن انجام شد. از روش برات میکرو دایلوژن برای سنجش تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید بر بیان ژن MexA پمپ افلاکس در باکتری مولد آن، ذرات نانوزیستی و کلرامفنیکل استفاده شد. در این روش از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای با ۱۲ ردیف که همه دارای ۱۰۰ میکرولیتر محیط تربیتون سویا برات (TSB) استریل است، استفاده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذره و آنتی‌بیوتیک به صورت جداگانه با رقت‌های مشخص به محیط TSB اضافه شد و رقیق‌سازی انجام شد. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی استاندارد به همه چاهک‌ها اضافه شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA با استفاده از کیت Total RNA Extraction mini Kit (یکتا تجهیز آزما، ایران) و بعد از تیمار کردن با نانوذرات اکسید مس و نانوذرات اکسیدمس/کلرامفنیکل استخراج شد. برای حذف DNA ژنومی از کیت RNase-free DNase (کیژن، هیلدن، آلمان) استفاده شد. بعد از استخراج RNA، برای اطمینان از صحت استخراج نمونه مورد نظر، جذب نوری بین ۲۳۰/۲۶۰ تا ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر با دستگاه نانودراپ بررسی شد. RNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

ساخت cDNA: برای تولید cDNA از کیت cDNA Synthesis Kit (یکتا تجهیز آزما، تهران) استفاده شد. در این روش بعد از انکوبه کردن RNA استخراج شده به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، فرایند نسخه برداری معکوس انجام شد. این فرایند با ۲ میکرولیتر راندوم پرایمر، ۰/۸ میکرولیتر آنزیم AMV Reverse Transcriptase، ۲ میکرولیتر Dntp 10mM، 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.

سنجش بیان ژن توسط تکنیک Real-Time PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت جنت کره جنوبی (Genet bio CAT. NO: Q9210) به صورت زیر انجام شد: ۱۰ میکرولیتر از Prime Qmaster mix (2x) with syber green، ۵ میکرولیتر از Depc water، یک میکرولیتر از هر پرایمر، یک میکرولیتر از Rox dye و دو میکرولیتر از cDNA استفاده شد.

دمایی، ۱ سیکل دناتوراسیون اولیه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، واسرشته شدن (Denaturation) ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر (Annealing) ۵۸ درجه برای ۳۰ ثانیه، طولیل شدن (Extension) ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده در Real-Time PCR و PCR برای ژن MexA R: GTCTTCACCTCGACACCC -F:CTCGACCCGATCTACGTC (C و ژن 16S Rrna R: F:CCAACCCCTTTTCCTTACTTGO) در نرم‌افزار Primer نسخه ۳ طراحی شد و سپس توسط شرکت سیناکلون ساخته شدند. محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد و در کنار DNA Ladder 100bp در بافر TBE به مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۱۰۰ قرار گرفت.^۲ برای رنگ‌آمیزی ژل، آن را به مدت ۱۵ دقیقه در تانک حاوی اتیدیوم بروماید قرار داده و نتایج توسط دستگاه Geldocument نور فربانفش حاصل شد. در کل واکنش‌های PCR از آب به عنوان کنترل منفی و از باکتری دارای ژن MexA به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.^۲

تهیه استاندارد نیم مک‌فارلند (Mc Farland Standard)

برای بررسی اثر مواد ضد میکروبی از سوسپانسیون باکتری با تراکم مناسب از استاندارد نیم مک‌فارلند سولفات باریم استفاده شد. برای تهیه این سوسپانسیون، ۵ میلی‌لیتر از کلرید باریم ۱ درصد با ۹/۹۵ میلی‌لیتر از اسید سولفوریک ۱ درصد مخلوط گردید. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، از کلنی تازه کشت شده باکتری (۱۶ تا ۲۴ ساعت) استفاده شد و در سرم فیزیولوژیک حل شد و چگالی کدورت با استفاده از اندازه‌گیری جذب در اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر بین ۸ درصد تا ۰/۱ مشخص شد.

رقیق سازی محلول نانوذرات اکسید مس

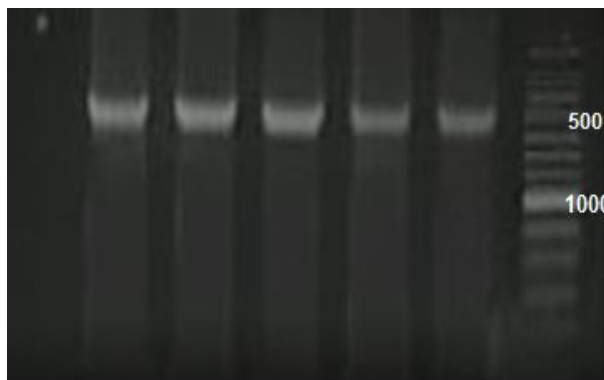
پودر نانوذرات مس (برند آرمینانو) از شرکت مهندسی پایدار ابتکار آرمینا خریداری شد و برای تهیه سری رقت از نانوذرات اکسید مس، سری رقت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۳۱/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد.

رقیق سازی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل

رقت‌های آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل بر اساس جدول موسسه استانداردهای آزمایشگاهی بالینی (CLSI) و با روش رقیق سازی سریالی انجام شد و سپس به نسبت ۱:۱۰۰ در محیط کشت رقیق شد. در نهایت با توجه به روش استاندارد کمیته ملی استانداردهای

نتایج تکثیر ژن حاصل از روش PCR

واکنش PCR روی ۴۹ سویه سودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری شده انجام شد. تکثیر ژن پمپ افلاکس MexA در سویه‌های باکتری، وجود باند ۵۰۰ bp در ژل الکتروفورز را نشان داد. سویه‌های دارنده ژن مورد نظر به عنوان کنترل مثبت (شکل ۱) در نظر گرفته شدند. نتایج بررسی مولکولی سویه‌ها نشان داد که تمام سویه‌ها دارای ژن مورد نظر بودند.



شکل ۱. نتایج الکتروفورز حاصل تکثیر ژن MexA (از راست به چپ: مارکر، کنترل مثبت، نمونه‌های مثبت حاوی ژن MexA، طول قطعه مورد نظر ۵۰۰ جفت باز است)

نتایج آزمون MIC

نتایج بررسی، حداقل غلظت مهار رشد سویه‌های باکتری برای نانوذرات اکسید مس ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای آنتی‌بیوتیک کلرامفنیل ۶۲/۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر را نشان داد.

بیان ژن MexA بعد از نزدیکی با مهارکننده‌های پمپ افلاکس

برای مقایسه تاثیر نانوذره اکسید مس و کلرامفنیکل بر بیان ژن MexA بیان ژن در دو گروه تیمار شده (به ترتیب تیمار شده با نانوذرات اکسید مس و تیمار شده با اثر هم‌افزایی نانوذرات/کلرامفنیکل) و تیمار نشده با استفاده از آنالیز منحنی ذوب (Melting curve analysis) و منحنی تکثیر بررسی شد (شکل ۱ و ۳).

میزان بیان ژن MexA در سویه‌های تیمار شده نسبت به نمونه کنترل تغییر نشان داد و بر اساس نتایج بررسی بیان ژن MexA، شاخص پی برای ژن MexA از ۰/۰۵ کمتر است که نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در بیان این دو گروه تیمار شده (به ترتیب تیمار شده با نانوذرات اکسید مس و تیمار شده با اثر هم‌افزایی نانوذرات/کلرامفنیکل) و تیمار نشده است.

قطعه‌های مورد نظر در ۳۵ چرخه تکثیر داده شد. از ژن خانگی 16s rRNA به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. برنامه دمایی Real-Time PCR (اپندورف، آلمان) به صورت ۱ سیکل دناتوراسیون اولیه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه، واسرشته شدن (Denaturation) ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر (Annealing) ۵۹ درجه برای ۴۰ ثانیه، طولیل شدن (Extension) ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه بود. آنالیز داده‌ها در نمونه‌های تیمار شده و کنترل به کمک معادله داده‌ها و رسم نمودارهای مربوطه از نرم‌افزار LightCycler Relative Quantification انجام شد. داده‌های مربوط به تغییر بیان ژن MexA با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ با فرض کارایی ۱۰۰ درصد و با استفاده از آزمون آماری تی مستقل در سه گروه تحلیل شد.

یافته‌ها

جمع‌آوری نمونه

تمام ۴۹ نمونه سودوموناس آئروژینوزا که از ۱۱ آزمایشگاه تشخیص طبی سطح شهر مشهد در سال های ۱۳۹۸-۱۳۹۹ جمع‌آوری شده بود، با استفاده از تست‌های تشخیصی به عنوان سودوموناس آئروژینوزا تایید شدند.

نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی

برای سویه‌های مقاوم سودوموناس آئروژینوزا تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی انجام شد. هاله با توجه به استاندارد CLSL بررسی شد و نتایج به صورت حساس (S) نیمه حساس (IM) و مقاوم (R) گزارش شد (جدول ۱). در این بررسی تمام سویه‌ها مقاومت به بیش از دو آنتی‌بیوتیک داشتند و از بین آنها، ۱۱ سویه به کلرامفنیکل مقاومت نشان دادند که از این سویه‌ها برای ادامه کار استفاده شد.

جدول ۱. نتایج آزمون آنتی‌بیوتیک

دیسک آنتی‌بیوتیک	حساس (درصد)	نیمه حساس (درصد)	مقاوم (درصد)
آموکسی‌سیلین/کلاونیک اسید (۳۰)	(۰)	(۰)	(۱۰۰)۴۹
جنتامایسین (GM10)	(۰)	(۰)	(۱۰۰)۴۹
کلیدامایسین (CC2)	(۰)	(۰)	(۱۰۰)۴۹
ایمی‌پنم (IMp10)	(۲۷/۵۳)۱۳	(۱۸/۳۶)۹	(۳۴/۶۹)۱۷
تتراسایکلین (TE30)	(۰)	(۰)	(۱۰۰)۴۹
سفتازیدیم (CAZ30)	(۰)	(۰)	(۱۰۰)۴۹
کلرامفنیکل (CH30)	(۶۳/۳۶)۳۱	(۱۴/۲۸)۷	(۲۲/۴۴)۱۱
سفازولین (CZ30)	(۰)	(۰)	(۱۰۰)۴۹
اریترومایسین (E15)	(۰)	(۰)	(۱۰۰)۴۹
سولفامتوکسازول (SXI)	(۰)	(۰)	(۱۰۰)۴۹

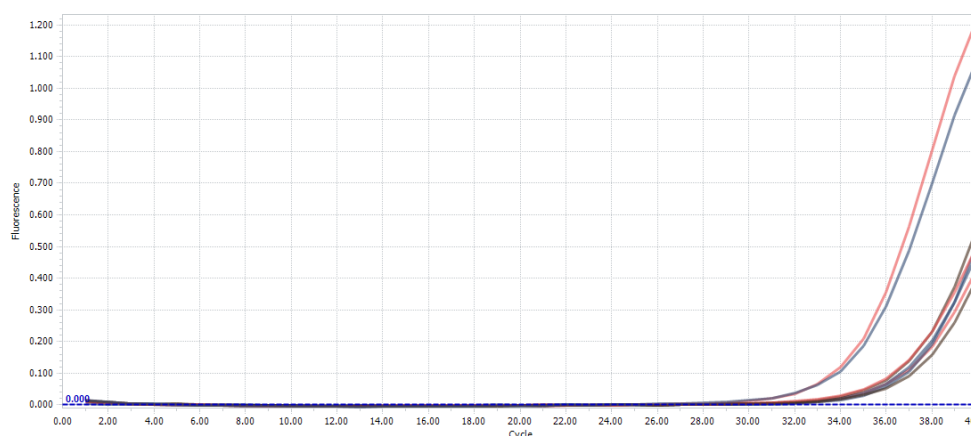
شده‌اند که با رنگ‌های مختلف نشان داده شده‌اند. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود ژن‌هایی که دارای بیان بیشتر بودند، Ct کمتری داشتند که در اینجا Ct نمونه‌های کنترل داخلی (16s rRNA) کمتر است و در منحنی زودتر وارد فاز Exponential شده است. نمونه‌های باکتری پس از تیمار با نانوذره اکسید مس و اکسید مس/کلرامفنیکل بیان ژن کمتر و Ct بیشتری داشتند. همان‌طور که در مورد شکل ۲ نشان داده شده است ژن‌های با Ct کمتر، بیان بیشتری دارند. در اینجا ژن‌های کنترل داخلی یا همان ژن ۱۶sRNA از سیکل پایین‌تر شروع به تکثیر کرده و در نهایت بیان بیشتری دارند و ژن‌های نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا بعد از تیمار، Ct‌های بیشتری دارند که نشان می‌دهد میزان بیان کمتری داشتند. بر اساس شکل ۲ و میزان Ct می‌توان گفت که میزان بیان ژن MexA در نمونه‌های باکتری پس از تیمار با نانوذرات اکسید مس و نانوذرات اکسید مس/کلرامفنیکل در مقایسه با نمونه باکتری قبل از تیمار به میزان معنی‌داری کاهش یافته است ($P=0.023$, $P=0.031$).

نمودار دمای ذوب حاصل از Real time PCR

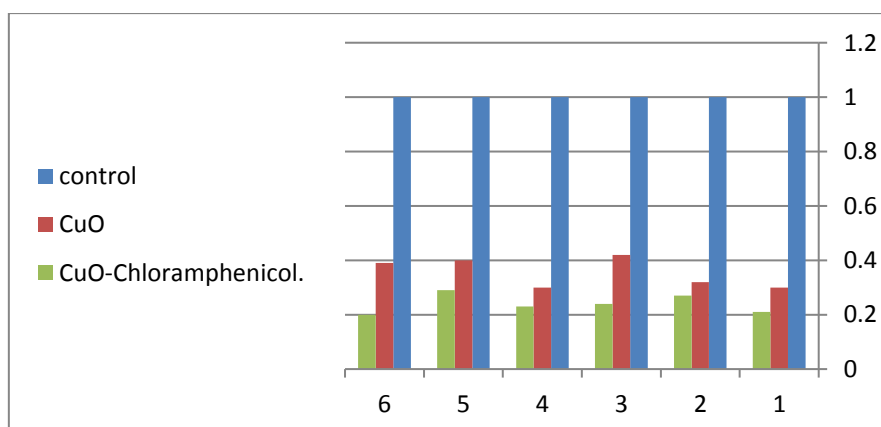
دمای ذوب برای DNA یک خاصیت ویژه محسوب می‌شود که به ساختمان DNA و تعداد نوکلئوتیدها، درصد CG و عوامل دیگری بستگی دارد. رنگ سایبرگرین قادر به تمایز بین محصولات مختلف نیست پس نمودار ذوب می‌تواند این اختلاف را نشان دهد. پس از پایان RT-PCR یکی دیگر از نمودارهایی که دستگاه به صورت خودکار به ما داده می‌شود، نمودار ذوب است. این کار با اندازه‌گیری تغییرات فلورسانس در دماهای مختلف صورت می‌گیرد. وجود یک پیک، نشانه صحیح بودن نمودار است. در این پژوهش تمام منحنی‌های ژن در تمام نمونه‌ها باهم منطبق بودند و نمودار دمای ذوب تمام قله‌ها روی یک دما قرار گرفت که نشان دهنده قابل قبول بودن آزمایش Real time PCR است.

منحنی تکثیر دستگاه Real time PC

در شکل ۲ منحنی تکثیر دستگاه Real time PCR نمایش داده شده است. در این شکل نمونه‌های باکتری قبل و بعد از تیمار با نانوذره اکسید مس و کلرامفنیکل و ژن کنترل داخلی بررسی



شکل ۲. نتایج محصول تکثیر Real-time PCR بر حسب سیکل



شکل ۳. مقایسه میزان بیان ژن MexA در نمونه‌های تیمار شده (نانوذره اکسید مس و اکسید مس/کلرامفنیکل) با نمونه کنترل

ترتیب ۹۳/۷، ۹۳/۴ و ۸۶/۷ درصد گزارش کردند که در مقایسه با مطالعه حاضر مقاومت مشابهی مشاهده می‌شود.^{۱۳}

در خصوص نحوه ایجاد این مقاومت، پاداپودولوس سال ۲۰۲۰ در یک مقاله مروری نشان داد که افلاکس پمپ‌ها به دلیل تنوع سوبسترای در ایجاد مقاومت چند دارویی بسیار قابل توجه هستند. در میان باکتری‌های گرم منفی سیستم افلاکس MexAB-OprM، یکی از افلاکس پمپ‌های با اهمیت بالا در مقاومت‌های چند دارویی سودوموناس آئروژینوزا بوده و تنها سیستم افلاکس پمپ ذاتی در این باکتری است.^{۱۴} در مطالعه‌ای که توسط جی-یونگ لی و همکاران در کره در سال ۲۰۱۲ انجام شد، از میان ۵۷ ایزوله مقاوم به کاربامپنم، ۳۲ (۵۶/۱٪) ایزوله افزایش بیان ژن MexAB-OprM و ۵۴ (۹۴/۷٪) ایزوله، کاهش بیان ژن OprD را نشان دادند.^{۱۵} در این پژوهش وجود این ژن در ۱۰۰ درصد از نمونه‌ها تایید شده است. این نتیجه برخلاف نتایج صالحی و همکاران در سال ۱۳۹۲ بود که نشان داد که تنها ۲۷ درصد سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزای مورد بررسی، ژن‌های MexAB-oprM را روی کروموزوم‌های خود دارند.^{۱۶} مطالعه دیگری در شهر همدان که توسط عربستانی و همکاران انجام شده بود، ژن MexAB-oprM را در صد در صد نمونه‌های مورد مطالعه گزارش کردند.^{۱۷} که این نتیجه با نتیجه این تحقیق همخوانی دارد.

این مطالعه نشان می‌دهد که نانوذرات اکسید مس اثر ضدباکتریایی قوی دارند و مشابه این نتیجه در مطالعات رشید و همکاران در سال ۲۰۲۱ دیده می‌شود که نشان داد که نانوذرات آنتی‌بیوتیک‌های نسل آینده هستند.^{۱۸} در خصوص غلظت موثر نانوذرات بر بیان ژن‌های پمپ افلاکس سودوموناس آئروژینوزا، دودی و همکاران نشان دادند که نانوذرات نقره با غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام در باسیل‌های گرم منفی بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام با طیف گسترده مانند سودوموناس آئروژینوزا، و بزرگترین قطر هاله عدم رشد را دارند.^{۱۹} غلظت‌های مشخصی از نانوذرات روی و اکسید روی نیز می‌توانند مانع رشد سودوموناس آئروژینوزا گردند.^{۲۰،۲۱}

نانوذرات آهن نیز با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌توانند نقش مهارکنندگی بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا داشته باشند.^{۲۲} همچنین مطالعات گذشته نشان داده است که نانوذرات فلزی مانند اکسید مس به دلیل داشتن توان ضد میکروبی می‌توانند به عنوان جایگزین یا مکمل برای آنتی‌بیوتیک‌ها بررسی شوند.^{۲۳} این نتیجه‌گیری توسط پژوهش

سودوموناس آئروژینوزا پاتوژن فرصت‌طلبی است که هنوز موفقیت لازم برای کنترل عفونت این باکتری حاصل نشده است.^۴ مقاومت سودوموناس آئروژینوزا به گروه‌های آنتی‌بیوتیکی مختلف مانند آمینوگلوکوزیدها، کینولون‌ها و بتالاکتام‌ها، درمان آنتی‌بیوتیکی عفونت‌های حاصل از این باکتری را با شکست مواجه کرده است.^{۶،۱۵} در خصوص مکانیسم مقاومت سودوموناس مطالعات زیادی صورت گرفته که نتایج این مطالعات بر حسب زمان و مکان متفاوت است. سودوموناس آئروژینوزا با مکانیسم‌های متفاوتی مقاومت به داروهای ضد میکروبی را کسب می‌کند. در میان این مکانیسم‌های متفاوت، سیستم‌های پمپ افلاکس غشایی نقش مهمی را در کسب مقاومت ذاتی باکتری به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها دارد.^۷ سودوموناس آئروژینوزا پتانسیل بیان ۱۲ نوع پمپ تراوشی مقاومت چند دارویی با عنوان Mex-Type Multidrug Resistance Efflux Pump را دارد که پنج پمپ MexAB-MexJK-، MexEF-oprN، MexCD-oprT، MexXY-OprM، oprM و oprM فراوان‌تر و مهم‌تر از بقیه هستند.^۸ MexAB-oprM مهم‌ترین سیستم خروج ترکیب‌های ضد میکروبی از سلول و مقاومت ذاتی دارویی در سودوموناس آئروژینوزا است و برخلاف سایر پمپ‌ها که اکتسابی هستند و اهمیت بالینی کمتری دارند، این پمپ تنها پمپ تراوشی است که در سویه‌های وحشی به صورت ذاتی بیان می‌شود.^۹ در مطالعه حاضر ارزیابی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، نشان داد که تمام سویه‌های جمع‌آوری شده مقاومت چند دارویی دارند. مطالعه سال ۲۰۱۲ که در نپال توسط چندر و همکاران انجام گرفت مقاومت به آمیکاسین ۲۵ و به سیپروفلوکساسین ۷۵ درصد گزارش شد که مقدار مقاومت به آمیکاسین کمتر از مطالعه حاضر است.^{۱۰} هم‌چنین در سال ۲۰۱۴ در گیلان، سلیمی شیرانی و همکاران مقاومت به توبرامایسین را ۲۱ درصد، آمیکاسین را ۱۱ درصد و جنتامایسین را ۹۷ درصد گزارش کردند.^{۱۱} مقاومت‌های به وجود آمده نسبت به جنتامایسین و توبرامایسین از این مطالعه با نتیجه به دست آمده این تحقیق مشابه است. کیان‌پور و خسروی در اصفهان (سال ۸۹) میزان مقاومت به آمیکاسین را ۵۸/۱۴ درصد گزارش کردند که مشابه تحقیق حاضر است.^{۱۲} هم‌چنین شاهچراغی و همکاران در سال ۲۰۰۳ در بیمارستان سوانح سوختگی شهید مطهری درصد مقاومت به جنتامایسین، آمیکاسین و سیپروفلوکساسین را به

کروموزومی در نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا، اجزای ژنی این سیستم می‌توانند به عنوان ابزار تشخیصی در شناسایی مولکولی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به دارو استفاده شوند.

قدردانی‌ها

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه شماره ۱۶۲۳۲۱۱۸ خانم فتن العزای برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی سلولی و مولکولی از دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد بود. از خانم بهاره سرگزی که در تمام مراحل اجرای پایان‌نامه مشاور طرح بودند و تمام کارشناسان محترم آزمایشگاه گروه زیست‌شناسی به خاطر همکاری در تمام مراحل، سپاسگزار می‌کنیم.

مشارکت پدیدآوران

فتن العزای جمع‌آوری نمونه‌ها، اجرای طرح و تهیه دست‌نوشته و گزارش‌ها، فرحناز مولوی طراحی و راهنمای پژوهش، تحلیل نتایج و نگارش مقاله و مریم طهرانی‌پور در اجرای مراحل عملی طرح مشارکت داشته و همچنین نسخه نهایی را خوانده و تایید کرده‌اند.

منابع مالی

این مقاله منابع مالی ندارد.

دسترس‌پذیری داده‌ها

همه داده‌های این مطالعه در این مقاله گنجانده شده است.

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در کمیته پزشکی دانشگاه آزاد استان خراسان به شماره مرجع IR.IAU.MSHD.REC.1400.019 تایید شده است.

تعارض منافع

مولفان اظهار می‌کنند که منافع متقابلی از تالیف و انتشار این مقاله ندارند.

حاضر تایید می‌شود و نانوذرات اکسید مس می‌توانند به تنهایی یا به همراه آنتی‌بیوتیک اثر ضد میکروبی موثر داشته باشند. در خصوص اثر هم‌افزای نانوذرات و آنتی‌بیوتیک‌ها، باتارسه و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثرات هم‌افزای نانوذره نقره را با کلرامفنیکل بررسی کردند و نتایج آنها نشان داد که خاصیت ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک با حضور نانوذرات افزایش می‌یابد و بیان کردند که احتمالاً دلیل این هم‌افزایی واکنش‌های پیوندی بین آنتی‌بیوتیک و نانوذرات است. مولکول‌های آنتی‌بیوتیک حاوی گروه‌های فعال زیادی مانند گروه‌های هیدروکسیل و آمینو هستند که از طریق کلاته شدن با نانوذرات واکنش داده و در نهایت منجر به باز شدن پیچ‌های DNA می‌گردند.^{۲۴} در سال ۲۰۱۴ لی و همکاران اثر هم‌افزای نانوذرات اکسید نقره و آنتی‌بیوتیک بتالاکتام را روی باکتری اشرشیاکلی به اثبات رساندند.^{۲۵} در مطالعه هندینی و همکاران در سال ۲۰۱۵ میلادی در مورد تولید نانوذرات نقره و اثرات سینرژیک آن‌ها در ترکیب با ایمپنم و دویوساید (کشنده زیستی) علیه بیوفیلم تشکیل شده توسط آسینتوباکتر بومانی، اثرات نانوذرات نقره به تنهایی و در ترکیب با بیوسایدها و ایمپنم بر ضد بیوفیلم‌های آسینتوباکتر بومانی و فرم پلانکتونی آن بررسی شد. طبق نتایج، نانوذرات نقره به تنهایی می‌توانند سبب مهار تشکیل بیوفیلم شوند اما اثر آن‌ها در ترکیب با ایمپنم بر ضد بیوفیلم‌ها و شکل پلانکتونی آسینتوباکتر بومانی موثرتر است.^{۲۶}

فدوی و همکاران نیز در سال ۲۰۲۱ اثر هم‌افزای نانوذرات اکسید روی را با انواع آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری سودوموناس آئروژینوزا اثبات کرد.^{۲۷} هاباش و همکاران در سال ۲۰۲۱ اثر هم‌افزای نانوذرات نقره با آرترون‌ام را در باکتری سودوموناس آئروژینوزا اثبات کردند.^{۲۸} تحقیق حاضر نیز اثر هم‌افزای نانوذرات و آنتی‌بیوتیک‌ها را تایید می‌کند.

نتیجه‌گیری

مطالعات اخیر نشان دهنده افزایش شیوع مقاومت در بین سوبه‌های سودوموناس آئروژینوزا است که یک هشدار جدی برای درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا در بیمارستان است. همچنین با توجه به مطالعه حاضر، استفاده از نانوذرات اکسید مس می‌تواند به عنوان گزینه‌ای برای کنترل عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا باشد. همچنین با توجه به حضور ژن‌های افلاکس MexAB-OprM به صورت

References

1. Kousovista R, Athanasiou C, Liaskonis K, Ivopoulou O, Karalis V. Association of Antibiotic Use with the Resistance Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in a Hospital Setting: A Four-Year Retrospective Time Series Analysis. *Scientia Pharmaceutica*. 2021 Mar;89(1):13. doi: 10.3390/scipharm89010013
2. Albadiri V, Molavi F, Tehranipoor M. 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.
3. Rojo-Bezares B, Cavalié L, Dubois D, Oswald E, Torres C, Sáenz Y. Characterization of carbapenem resistance mechanisms and integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains from blood samples in a French hospital. *Journal of Medical Microbiology*. 2016 Apr 1;65(4):311-9. doi: 10.1099/jmm.0.000225
4. Zahedani SS, Tahmasebi H, Jahantigh M. Coexistence of virulence factors and efflux pump genes in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: Analysis of biofilm-forming strains from Iran. *International Journal of Microbiology*. 2021 May 21;2021:25-32. doi: 10.1155/2021/5557361
5. 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. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2016 Apr 1;12(4):762-9. doi: 10.1166/jbn.2016.2222
6. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in medicinal chemistry*. 2014 Jan;6:PMC-S14459.
7. La Rosa R, Rossi E, Feist AM, Johansen HK, Molin S. Compensatory evolution of *Pseudomonas aeruginosa*'s slow growth phenotype suggests mechanisms of adaptation in cystic fibrosis. *Nature Communications*. 2021 May 27;12(1):1-5. doi: 10.1038/s41467-021-23451-y
8. Goli HR, Nahaei MR, Rezaee MA, Hasani A, Kafil HS, Aghazadeh M, et al. Role of MexAB-OprM and MexXY-OprM efflux pumps and class 1 integrons in resistance to antibiotics in burn and Intensive Care Unit isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Of Infection and Public Health*. 2018 May 1;11(3):364-72. doi: 10.1016/j.jiph.2017.09.016
9. Nehme D, Poole K. Assembly of the MexAB-OprM multidrug pump of *Pseudomonas aeruginosa*: component interactions defined by the study of pump mutant suppressors. *Journal of bacteriology*. 2007 Sep 1;189(17):6118-27. doi: 10.1128/jb.00718-07
10. Anil C, Shahid RM. Antimicrobial susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates at a tertiary care hospital in Kathmandu, Nepal. *Asian J Pharm Clin Res*. 2013;6(3):235-8.
11. 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. <http://ijmm.ir/article-1-290-en.html> (Article in Persian)
12. Kianpoor F, Khosravi A. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo beta lactamases from infections in burned patients and identification of blaIMP and blaVIM genes by PCR %J Iranian Journal of Medical Microbiology 2007;1(1):23-31.
13. Shahcheraghi F, Feizabadi MM, Yamin V, Abiri R, Abedian Z. Serovar determination, drug resistance patterns and plasmid profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients at two hospitals of Tehran (IRAN). *Burns*. 2003 Sep 1;29(6):547-51. doi: 10.1016/s0305-4179(03)00142-6
14. Papadopoulos I, Lazzarino R, Koulouglioti C, Aagard M, Akman Ö, Alpers LM, et al. Obstacles to compassion-giving among nursing and midwifery managers: an international study. *International Nursing Review*. 2020 Dec;67(4):453-65. doi: 10.1111/inr.12611
15. Lee JY, Lee SE, Lee DW. Current status and future prospects of biological routes to bio-based products using raw materials, wastes, and residues as renewable resources. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2021 Jan 28:1-57. doi: 10.1080/10643389.2021.1880259
16. Salehi M, Hekmatdoost M, Hosseini F. Quinolone resistance associated with efflux pumps mexAB-oprM in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbial World*. 2014 Mar 1;6(4):290-8.
17. Arabestani MR, Rajabpour M, Yousefi Mashouf R, Alikhani MY, Mousavi SM. Expression of efflux pump MexAB-OprM and OprD of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples using qRT-PCR. *Archives of Iranian Medicine*. 2015;18(2):102-8.

18. Rashid A, Molavi F, Mahmoudzadeh H. The effect of silver nanoparticles on *mecA* gene expression in methicillin-resistant samples of *Staphylococcus aureus*. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*. 2020 Nov 10;11(41):67-82.
19. 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 Oct 10;5(2):44-51.
20. 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;10:5025. doi: 10.2147/ijn.s85219.
21. Lee JH, Kim YG, Cho MH, Lee J. ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiological research*. 2014 Dec 1;169(12):888-96. doi: 10.1016/j.micres.2014.05.005.
22. Haney CE. Effects on Iron Nanoparticles on *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms: University of Dayton; Graduate Theses and Dissertations. 490. 2011.
23. Hemeg HA. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *International Journal of Nanomedicine*. 2017;12:8211. doi: 10.2147/ijn.s132163
24. Batarseh KI. Anomaly and correlation of killing in the therapeutic properties of silver (I) chelation with glutamic and tartaric acids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004 Aug 1;54(2):546-8. doi: 10.1093/jac/dkh349
25. Li B, Li M, Qu L, Wang M, Guo J. Prevalence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from paediatric inpatients with respiratory tract infections at a teaching hospital in China. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2014 Mar 1;46(3):200-3. doi: 10.3109/00365548.2013.859393
26. Hendiani S, Ahya Aa, Mohammadi P, Kharazi S. Synthesis of silver nanoparticles and its synergistic effects in combination with imipenem and two biocides against biofilm producing *Acinetobacter baumannii*. 2015;2(3):291-8.
27. Fadwa AO, Alkoblan DK, Mateen A, Albarag AM. Synergistic effects of zinc oxide nanoparticles and various antibiotics combination against *Pseudomonas aeruginosa* clinically isolated bacterial strains. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2021 Jan 1;28(1):928-35. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.09.064
28. Habash MB, Park AJ, Vis EC, Harris RJ, Khursigara CM. Synergy of silver nanoparticles and aztreonam against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014 Oct;58(10):5818-30. doi: 10.1128/aac.03170-14