



## The evaluation of the effect of gold nanoparticles on the expression of (MexA/B) efflux pump genes from the RND family in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains

Nehleh Falahati <sup>1</sup>, Hoshang Jamali <sup>2</sup>, Mohammad Kargar <sup>3</sup>, Farshid kafilzadeh <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ph.D. student, Department of Microbiology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. <sup>2</sup>Assistant Professor, Department of Microbiology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. <sup>3</sup>Professor, Department of Microbiology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

### Abstract

**Background and purpose:** *Pseudomonas aeruginosa* has several protein pumps with which it puts antibiotics out. This has led to the formation of multidrug resistance. The aim of this study was to investigate the effect of gold nanoparticles on the expression of mexA/B genes in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains.

**Materials and Methods:** In this cross-sectional descriptive study, 74 suspected samples of *Pseudomonas* genus were collected and phenotypic and genotypic tests were used to screen *Pseudomonas aeruginosa*. Then, anibiogram test using 11 antibiotics from different classes was performed by the use of CLSI 2020 standard tables and the disk diffusion method. The frequency of mexA/B genes was evaluated by polymerase chain reaction method and after determining the minimum inhibitory concentration of gold nanoparticles, the effect of gold nanoparticles on the expression of mexA/B genes was evaluated using SYBER Green-Real Time PCR technique.

**Results:** In this study (67.57%) 50 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were identified. The highest and lowest levels of antibiotic resistance were related to azteronam (98%) and cefpime (26%). The prevalence of mexA/B genes was respectively MexA (74%), mexB (70%) and mexA/B (58%) and also 12% lacked both genes. Gold nanoparticles showed growth inhibitory effect at MIC  $\geq$  50ppm and at 25 ppm concentration with ciprofloxacin, showed inhibitory effect on the expression of mexA/B genes.

**Conclusion:** The results of this study showed that gold nanoparticles can inhibit the expression of mexA and mexB genes in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Due to the fact that gold nanoparticle does not have toxic effects on eukaryotic cells, it can be important in the treatment process of this group of bacteria.

**Keywords:** Gold nanoparticles, *Pseudomonas aeruginosa*, MexA/B, Multidrug resistance.

Received: 29 December 2021

Revised: 8 April 2022

Accepted: 30 April 2022

Correspondence to: Nehleh Falahati

Tel: +98 9171311319

E-mail: h.jamali1970@gmail.com

Journal of Microbial World 2022, 15(1): 78-87

DOI:10.30495/jmw.2022.1932317.1978



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



## ارزیابی تاثیر نانوذرات طلا بر بیان ژنهای پمپ افلاکس MexA/B از خانواده RND در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزهای مقاوم به چند دارو

نحله فلاحی<sup>۱</sup>، هوشنگ جمالی<sup>۲\*</sup>، محمد کارگر<sup>۳</sup>، فرشید کفیل زاده<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران. <sup>۲</sup> استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران. <sup>۳</sup> استاد، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** سودوموناس آئروژینوزا دارای چندین پمپ پروتئینی است که با آن‌ها آنتی‌بیوتیک‌ها را به بیرون تخلیه می‌کند. این موضوع باعث شکل‌گیری مقاومت‌های چند دارویی شده است. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر نانوذرات طلا بر روی بیان ژن‌های mexA/B در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به چند دارو بوده است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مقطعی-توصیفی تعداد ۷۴ نمونه مشکوک به جنس سودوموناس جمع‌آوری و از تست‌های فنوتیپی و ژنوتیپی برای غربالگری سودوموناس آئروژینوزا استفاده شد. سپس با استفاده از جداول استاندارد CLSI 2020 و به روش انتشار دیسک با بکارگیری ۱۱ آنتی‌بیوتیک از کلاس‌های مختلف، تست آنتی‌بیوگرام انجام شد. فراوانی ژن‌های mexA/B به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس بررسی گردید و پس از تعیین حداقل غلظت بازدارندگی نانوذرات طلا، تاثیر نانوذرات طلا بر بیان ژن‌های mexA/B با استفاده از تکنیک SYBER Green-Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** در این مطالعه (۶۷/۵۷٪) ۵۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شد. بیشترین و کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آزترونام (۹۸٪) و سفپیم (۲۶٪) بود. میزان شیوع ژن‌ها به ترتیب، mexA (74%)، mexB (70%) و mexA/B (58%) و ۱۲٪ نیز فاقد هر دو ژن بودند. نانوذرات طلا در MIC  $\leq 50$  ppm اثر بازدارندگی رشد و در غلظت 25 ppm به همراه سیپروفلوکساسین، اثر بازدارندگی در بیان ژن‌های mexA/B از خود نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** نانو ذرات طلا می‌توانند از بیان ژن‌های mexA و mexB در سودوموناس آئروژینوزاهای مقاوم به چند دارو جلوگیری کنند. باتوجه به اینکه نانوذره طلا اثرات سمی بر سلول‌های یوکاریوتی ندارد، می‌تواند در فرایند درمان این گروه از باکتری‌ها، حائز اهمیت باشد.

**واژگان کلیدی:** نانوذرات طلا، سودوموناس آئروژینوزا، mexA/B، مقاومت چنددارویی.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۲/۱۰

ویرایش مقاله: ۱۴۰۱/۱/۱۹

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۰/۸

### مقدمه

شده است (۱). علاوه بر این، تخمین زده می‌شود که تا سال ۲۰۵۰، میزان عفونت و مرگ و میر ناشی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی از ۱۰ میلیون نفر نیز فراتر رود. بطوریکه جایگزین سرطان به عنوان عامل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان خواهد شد (۲).

تعداد مرگ و میر ناشی از باکتری‌های مقاوم به چند دارو (MDR) در سراسر جهان سالانه حدود ۷۰۰۰۰۰ مرگ برآورد

(\* آدرس برای مکاتبه: گروه میکروپ شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، ایران.  
تلفن: ۰۹۱۷۱۳۱۱۳۱۹  
پست الکترونیک: h.jamali1970@gmail.com



به دلیل ظهور و گسترش مقاومت دارویی در عوامل بیماریزای باکتریایی، آنتی بیوتیکها اغلب در طول زمان اثر خود را از دست می دهند. به اصطلاح بحران مقاومت آنتی بیوتیکی ناشی از باکتری های مقاوم به دارو ایجاد می شود. در مواجهه با این وضعیت فزاینده شدید، کشف عوامل ضد باکتریایی جدید و استراتژی های درمانی ضروری است (۳).

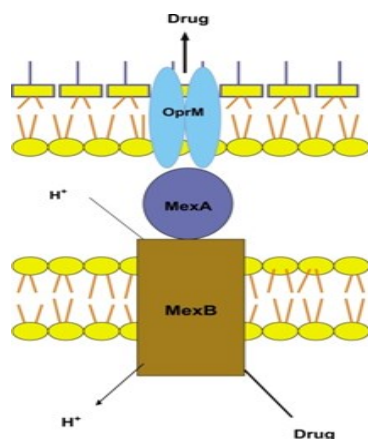
درمان عفونت های ناشی از عوامل بیماریزا مقاوم به چند دارو (MDR) بسیار مشکل است و به عنوان یک تهدید عمده شناخته می شود. حدود ۸ درصد از عفونت های بیمارستانی گزارش شده به مراکز کنترل و پیشگیری از بیماری ها در ایالات متحده به سودوموناس آئروژینوزا نسبت داده شده است (۴).

سودوموناس آئروژینوزا بر اساس گزارش مرکز مراقبت های بهداشتی ایالات متحده، دومین علت شایع ذات الریه، ششمین عامل بیماریزای فرصت طلب و هفتمین علت شایع عفونت خون مرتبط با کاتتر در ۲۸۰۰۰ مورد عفونت های بیمارستانی بوده که در طی ۴۶ ماه در ۴۶۳ بیمارستان ثبت شده است (۵).

غشای خارجی باکتری های گرم منفی دارای ساختار نامتقارنی از لیپوپلی ساکاریدها (LPS)، فسفولیپید و کانال های پورین، مانند OmpC و OmpF، است. بسیاری از ترکیباتی که می توانند از طریق غشای خارجی عبور کنند مجدداً توسط پمپ های پخش به خارج (افلاکس) از سلول به بیرون رانده می شوند (۴).

پمپ های افلاکس نقش مهمی در سم زدایی دارویی در انواع مختلف باکتری ها دارند (۶). این پمپ ها بر اساس سه معیار: توالی اسید آمینه، منبع انرژی مورد نیاز برای افزایش برون دهی و ویژگی های سوپسترا به شش دسته MFS، ATP-ABC، SMR، RND، MATE، PACE تقسیم می شوند (۷).

سیستم RND بخشی از سیستم حفاظت باکتریایی برضد اکسیژن فعال (ROS) و مکانیسم دفاعی میزبان است. سیستم RND از نیروی محرک پروتون به منظور خارج کردن داروهای سمی از سیتوزول یا فضای پری پلاسمایی به خارج از باکتری استفاده می کند. تنظیم بیان ژن های RND اغلب توسط ژن های بالادست اپرون و تنظیم کننده هایی مانند نمک صفراوی و اسید چرب صورت می گیرد (۸). سیستم RND می تواند باعث کاهش



شکل ۱: ساختار پمپ افلاکس MexAB-OprM.

نانوذرات دارای خواص فیزیکوشیمیایی متمایزی همچون نسبت سطح به حجم بالا و اندازه کوچک هستند. مطالعات نشان داده اند که این ویژگی ها می توانند نانوذرات را قادر سازد تا به عنوان حامل، دارو را به درون باکتری وارد کرده و باعث افزایش تاثیر دارو شود (۱۲). نانوذرات در اندازه محدود بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر و نسبت سطح به حجم زیاد دارای اثر ضد میکروبی بر روی عوامل بیماریزای مقاوم به چند دارو هستند. آن ها باعث تغییر در نفوذپذیری غشای سلولی و مهار پمپ های افلاکس شده و نیز باعث آسیب به کروموزوم، پروتئین ها و عمل فسفوریلاسیون می شوند. اصلی ترین اثرات ضد میکروبی نانوذرات فلزی مربوط به آزاد سازی یون ها و تولید ROS هایی همچون سوپراکسید  $O_2^-$  می باشد (۱۴ و ۱۳).

(۱۸) به منظور تایید جنس سودوموناس و *LasI* (۱۹) به منظور تایید گونه آئروژینوزا (سفارش شده به شرکت پیشگام تهران) مندرج در جدول ۱ و همچنین برنامه دمایی طبق جدول ۲، بررسی ژنوتیپی بر روی نمونه‌های مشکوک به جنس سودوموناس انجام شد. واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس شرکت سینناژن، ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۲/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها با غلظت ۱۰ پیکومول و ۲ میکرولیتر DNA الگو در ۳۰ سیکل برای هر دو ژن انجام شد. در آخر محصولات PCR در ژل آگارز ۱٪ و با ولتاژ ۹۵ مورد مطالعه قرار گرفتند. در این آزمون از سویه سودوموناس آئروژینوزا ATTC 37853 به منظور استاندارد سازی استفاده گردید.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده.

منبع	طول محصول	پرایمر ۳' → ۵'	ژن
(۱۸)	198bp	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT TATTACCGCGGCTGCTGGC	s rRNA16
(۱۹)	607bp	ATGATCGTACAAAATTGGTCGG GTCATGAAACCGCCAGTC	<i>LasI</i>
طراحی شده	138bp	ATTCTCCGAGGTTTCCGTCG AGGATGGCCTTCTGCTTGAC	<i>mexA</i>
طراحی شده	120bp	GGGATCGACAATCTGCGCTA CTTGTCTGCACCTGGACCT	<i>mxB</i>
طراحی شده	130bp	TCTACCAGCATGTAGCGCAG AGCCCTACAAGAAATCCGCC	<i>gyrB</i>

جدول ۲: برنامه دمایی پرایمرهای مورد استفاده.

گسترش نهایی	گسترش	اتصال	واشرش اولیه	واشرش
۷۲°C	۷۲°C	۵۷/۵°C	۹۴°C	۹۴°C
۵ دقیقه	۱ دقیقه	۳۰ ثانیه	۵ دقیقه	۴۵ ثانیه
۷۲°C	۷۲°C	۵۸°C	۹۵°C	۹۴°C
۵ دقیقه	۳۰ ثانیه	۳۰ ثانیه	۵ دقیقه	۳۰ ثانیه
۷۲°C	۷۲°C	۵۷°C	۹۴°C	۹۴°C
۵ دقیقه	۱ دقیقه	۱ دقیقه	۵ دقیقه	۱ دقیقه
۷۲°C	۷۲°C	۵۷°C	۹۴°C	۹۴°C
۵ دقیقه	۱ دقیقه	۱ دقیقه	۵ دقیقه	۱ دقیقه
۷۲°C	۷۲°C	۵۸°C	۹۴°C	۹۴°C
۵ دقیقه	۱ دقیقه	۱ دقیقه	۵ دقیقه	۱ دقیقه

(ب) تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی: برای همه نمونه‌ها با استفاده از جداول استاندارد CLS۲۰۲۰-M100 و با بکارگیری آنتی‌بیوتیک‌های پپراسیلین (۱۰۰ میکروگرم)، تیکارسیلین

خواص منحصر به فرد نانوذرات طلا، مانند اندازه، شکل، خواص سطحی، خواص نوری، سازگاری زیستی، سمیت کم، پایداری بالا، آن را در بسیاری از زمینه‌های پزشکی جذاب کرده است. با توجه به ساختار نانوذرات طلا، برخی از محققان در گذشته از آن برای آزمایش روی بیماری لته، پوسیدگی دندان، مهندسی بافت، کاشت دندان و تشخیص سرطان استفاده کرده‌اند. داروهای ضد باکتریایی می‌توانند از طریق پیوندهای غیر کووالانسی یا کووالانسی به نانوذرات متصل شوند. با استفاده از نانوذرات طلا به عنوان حامل داروهای ضدباکتریایی، داروها راحت تر به جایگاه خود متصل شده و اثرات ضد باکتریایی بهتری از خود نشان می‌دهند (۱۶ و ۱۵). نانوذرات طلا غیرسمی محسوب می‌شوند، اما موادی که برای تهیه و اصلاح آن استفاده می‌شوند ممکن است سمی باشند. فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات طلا در برابر باکتری‌های مقاوم به چند دارو، ممکن است باعث ایجاد باکتری‌های مقاوم در برابر نانوذرات طلا شود (۱۷). این مطالعه با هدف بررسی میزان فراوانی ژن‌های *mexA/B* مرتبط با پمپ‌های افلاکس سودوموناس آئروژینوزا و قدرت بازدارندگی نانوذرات طلا بر بیان آن‌ها انجام شده است.

## مواد و روش‌ها

(الف) نمونه‌گیری، کشت و غربالگری جدایه‌ها: در این مطالعه مقطعی در طی ۳ ماه (تیرماه تا شهریورماه ۹۸)، تعداد ۷۴ نمونه مشکوک به جنس سودوموناس از آزمایشگاه‌ها و بیمارستان‌های دو شهر جهرم (۲۸ نمونه) و شیراز (۴۶ نمونه) جمع‌آوری گردید. پس از کشت بر روی محیط‌هایی همچون نوترینت آگار و سودوموناس P، کلنی‌های مشکوک به جنس سودوموناس که دارای تست اکسیداز مثبت بودند، جمع‌آوری و خالص سازی شدند. سپس با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی TSI، Citrate، Motility، Urease، OF، OD و LD برای آن‌ها تست تایید فنوتیپی گذاشته شد.

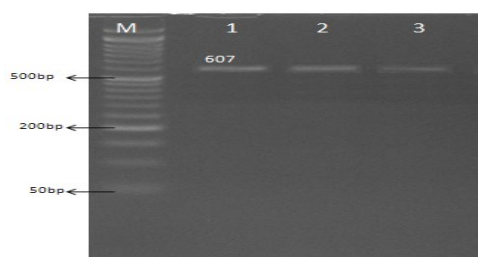
(ب) واکنش زنجیره پلی‌مرز (بررسی ژنوتیپی): پس از تخلیص DNA نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت یکتا تجهیز)، با استفاده از دو پرایمر 16s rRNA

مورد نظر تا غلظت ۳۲ میگروگرم برلیتر می تواند رشد کند. در همین وضعیت تحمل آنتی بیوتیکی، از محیط نمونه گرفته شد و سپس با استفاده از کیت EURx ساخت کشور لهستان ابتدا cDNA و سپس برای آن Real time گذاشته شد. باتوجه به این که سویه مورد آزمون غلظت ۲۵ppm نانوذره طلا را تحمل کرده بود، یک بار دیگر آزمون تکرار گردید ولی این بار نانو ذره طلا نیز به آن اضافه شد و اثر بازدارندگی آن بر بیان ژنها مورد مطالعه قرار گرفت.

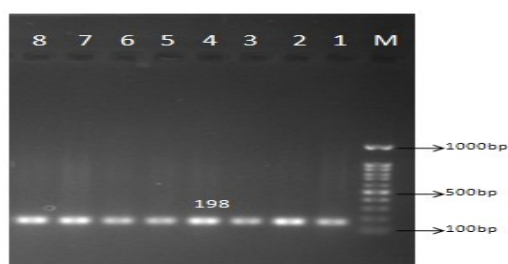
(و) *آنالیز آماری*: پس از جمع آوری دادهها به کمک نرم افزار SPSS 20، با استفاده از آزمون Paired sample T Test ارتباط معنی دار مقدار Ct های بدست آمده محاسبه گردید. همچنین با استفاده از نتایج بدست آمده از ژن محافظت شده *gyrA* مقدار Delta Ct از نوع لگاریتمی برپایه ۲ و  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ژنها محاسبه گردید.

### یافته‌ها

در این پژوهش پس از انجام آزمونهای فنوتیپی و ژنوتیپی (شکل ۲ و ۳)، از مجموع ۷۴ نمونه جمع آوری شده، ۵۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا جداسازی گردید.



شکل ۲: الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *LasI* (M. Ladder 1 Kb)، (۱) کنترل مثبت، (۲-۳) نمونه‌های مثبت (۶۰۷ جفت باز).



شکل ۳: الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *16S rRNA* (M. Ladder 1 Kb)، (۱) کنترل مثبت، (۲-۸) نمونه‌های مثبت (۱۹۸ جفت باز).

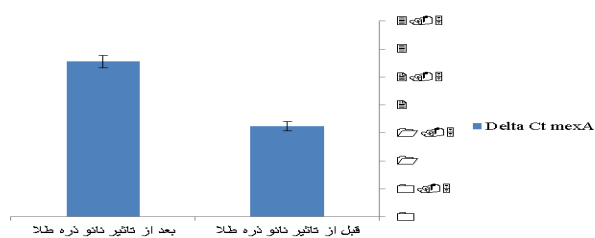
(۷۵ میگروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میگروگرم)، سفپیم (۳۰ میگروگرم)، آزترونام (۳۰ میگروگرم)، ایمپ پنم (۱۰ میگروگرم)، مروپنم (۱۰ میگروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میگروگرم)، تویرامایسین (۱۰ میگروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میگروگرم) و سیپروفلوکساسین (۵ میگروگرم) شرکت اندیشه آزما، تست آنتی بیوگرام به روش انتشار دیسک (کربی بوئر) انجام شد (۲۰).

(ج) *بررسی فراوانی ژنهای پمپ افلاکس (mexA/B)*: میزان فراوانی ژنهای *mexA/B* با استفاده از دو پرایمر طراحی شده در سایت NCBI مندرج در جدول ۱ (سفارش شده به شرکت پیشگام تهران) و همچنین برنامه دمایی جدول ۲ در تمام جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا بررسی گردید. واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس شرکت سینازن، ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۲/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها با غلظت ۱۰ پیکومول و ۲ میکرولیتر DNA الگو در ۳۰ سیکل برای هر دو ژن انجام شد. در آخر محصولات PCR در ژل آگارز ۱٪ و با ولتاژ ۹۵ مورد مطالعه قرار گرفتند.

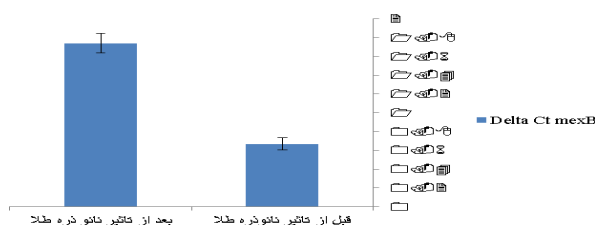
(د) *حداقل غلظت تاثیر نانو ذرات طلا*: به منظور انجام آزمون MIC، از شرکت کیمیا اکسیر شیراز نانو ذره طلا با غلظت ۲۰۰ ppm و با سایز ۳۰-۲۵ نانومتر خریداری و آزمون بصورت تهیه رقت در ۱۰ لوله انجام شد. لازم به ذکر است که به منظور تاثیر بهتر نانو ذرات طلا، کدورت ۰/۵ مک فارلند ۵ بار رقیق گردید. پس از اضافه کردن باکتری، غلظت‌های (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۳، ۱/۶، ۰/۸ و ۰/۴) ppm نانوذره طلا درون لوله‌ها بدست آمد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۲۴ درجه سلسیوس، کدورت و شفافیت لوله‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

(ه) *بیان ژنهای پمپ افلاکس در حضور نانوذرات طلا*: به منظور بررسی تاثیر نانوذره طلا بر بیان ژنهای *mexA* و *mexB* و *gyrA* ابتدا برای یکی از سویه‌هایی که بیشترین مقاومت را در برابر تاثیر نانوذره طلا از خود نشان داده بود، تست MIC برای آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین انجام و مشخص شد که سویه

نتایج تاثیر نانو ذرات طلا بر بیان ژنهای *mexA/B* از سیستم RND نشان داد پس از تاثیر نانو ذره بیان ژن *mexA* به میزان ۱/۷۱ و بیان ژن *mexB* به میزان ۲/۶۱ بار نسبت به وضعیت نرمال کاهش داشته است. به عبارت بهتر نانو ذره موفق شده است باعث کاهش بیان ژن‌ها شود (شکل ۶ و ۷).

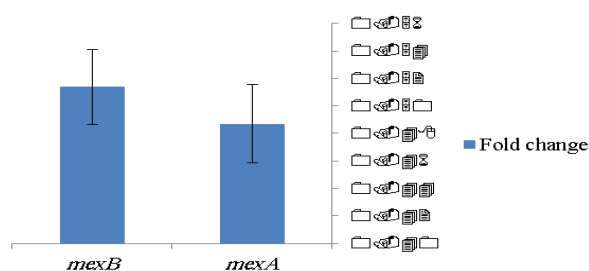


شکل ۶: تاثیر نانو ذره طلا بر بیان ژن *mexA* سودوموناس آئروژینوزا.



شکل ۷: تاثیر نانو ذره طلا بر بیان ژن *mexB* سودوموناس آئروژینوزا.

همچنین مقایسه Foldchange ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) ژنهای مورد مطالعه (شکل ۸) نشان می‌دهد که ژن *mexA* به میزان ۱/۶۰ بار بیان کمتری نسبت به ژن *mexB* داشته است.



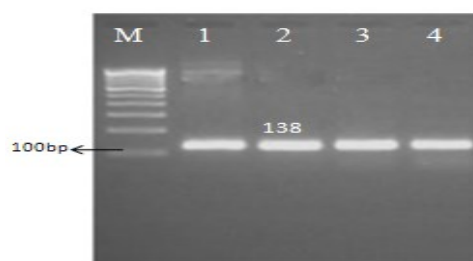
شکل ۸: تفاوت Foldchange دو ژن *mexB* و *mexA* پس از تاثیر نانو ذره طلا.

### بحث

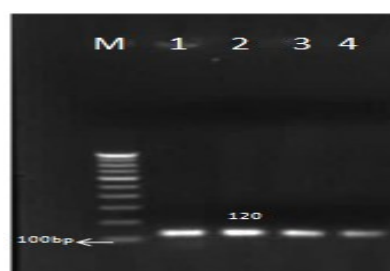
در این مطالعه از مجموع ۷۴ نمونه جمع‌آوری شده از مراکز آزمایشگاهی، (۶۷/۵۷٪) ۵۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا براساس تست‌های فنوتیپی و ژنوتیپی جداسازی گردید. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به آزترونام و کمترین مقاومت

بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا مربوط به آزترونام (۹۸٪) و کمترین مقاومت مربوط به سفپیم (۲۶٪) بود. همچنین ۸۴٪ نمونه‌ها مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه (MDR) داشتند.

مطالعه مولکولی ژنهای *mexA/B* از سیستم RND نشان داد که ۷۴٪ از جدایه‌ها واجد *mexA*، ۷۰٪ واجد *mexB* (شکل ۵ و ۶) و فقط ۵۸٪ نمونه‌ها هر دو ژن را با هم داشتند. از جمله نتایج دیگری که بدست آمد همزمانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و وجود هر دو ژن در سویه‌های مورد مطالعه بود بطوریکه این مقدار به ترتیب برای آزترونام (۵۶٪)، تیکارسیلین (۴۲٪)، پپراسیلین (۳۶٪)، ایمی پنم (۳۲٪)، آمیکاسین (۳۲٪)، جنتامایسین (۳۰٪)، سیپروفلوکساسین (۳۰٪)، مروپنم (۲۴٪)، توبرامایسین (۲۲٪)، سفنازیدیم (۲۰٪) و سفپیم (۱۴٪) بود.



شکل ۴: الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *mexA*. (M، Ladder 1 Kb، ۱) کنترل مثبت، ۲-۴) نمونه‌های مثبت (۱۳۸ جفت باز).



شکل ۵: الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *mexB*. (M، Ladder 1 Kb، ۱) کنترل مثبت، ۲-۴) نمونه‌های مثبت (۱۲۰ جفت باز).

نتایج حاصل از MIC نانوذرات طلا رفتار متفاوتی را در بین جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا نشان داد. بطوریکه MIC برای ۱۱ جدایه  $\geq 50$  ppm، برای ۱۹ جدایه  $\geq 250$  ppm، برای ۱۶ جدایه  $\geq 50/12$  ppm و برای ۴ جدایه  $\geq 250/6$  ppm بدست آمد.

همانند پژوهش حاضر در سایر تحقیقات نیز مشخص گردیده است که نانوذرات طلا می‌تواند اثر بازدارندگی بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا داشته باشد.

یکی از راه‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، وجود پروتئین‌هایی به نام پمپ افلاکس (سیستم پخش به خارج) در غشاء باکتری است. در سودوموناس آئروژینوزا مهمترین پمپ افلاکس، MexAB-OprM است. در پژوهش حاضر فراوانی ژن‌های *mexA* و *mexB* به ترتیب ۷۴ و ۷۰ درصد و همزمانی آن‌ها ۵۸٪ محاسبه گردید. همانگونه که در نتایج دیده شد، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌هایی که هر دو ژن را با هم دارند، مربوط به آزترونام و کمترین آن مربوط به سفپیم بوده است. نتایج این تحقیق همچنین بیان می‌کند که نانوذرات طلا می‌تواند در کاهش بیان هر دو ژن نقش داشته باشند. مطالعات سایر محققین بیشتر بر روی سایر نانوذرات بوده است بطوری که احمد و همکاران در سال ۲۰۲۱ با تاثیر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر بیان دو ژن *mexA/B* مشاهده کردند که میزان بیان هر دو ژن کاهش و تاثیر درمان با آنتی‌بیوتیک بیشتر شده است (۲۸). شریف در سال ۲۰۱۹ تاثیر کمی از اکسید روی را بر بیان ژن *mexA* مشاهده نمود (۲۹). عبدالحسینی در سال ۲۰۱۹ با ترکیب گلوتامیک اسید و تیوسمی کاربازید اثر سپروفلوکساسین تشدید و میزان بیان ژن‌های *mexA/B* را کاهش داد (۳۰). دشتی زاده و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ میزان شیوع ژن‌های *mexA* و *mexB* را در سودوموناس آئروژینوزاهای مورد مطالعه به ترتیب ۹۲/۴۲ و ۸۷/۸۷ درصد اعلام کردند (۳۱).

به دلیل کوچک بودن اندازه نانوذره طلا که  $10^3$  بار از باکتری کوچکتر است (با ۴ تا ۵ نانومتر قطر) و همچنین سمی نبودن آن برای سلول‌های یوکاریوتی (۹)، نتایج این پژوهش می‌تواند زمینه سازی برای مطالعات بعدی و استفاده از نانو ذره طلا به عنوان یک حامل و عامل بازدارنده رشد باشد.

### نتیجه گیری

با توجه به میزان بالای مقاومت چند دارویی و همچنین

مربوط به سفپیم بوده است. همچنین ۸۴٪ از نمونه‌ها مقاومت چند دارویی از خود نشان دادند. با توجه به بالا بودن درصد مقاومت چند دارویی و نگرانی‌هایی که پیامد آن شکل می‌گیرد، فراهم نمودن راه کارهای مناسبی به منظور درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند امیدوار کننده باشد.

حساسیت موضوع باعث شده است تا در سراسر جهان سالانه مطالعات زیادی در زمینه مقاومت چند دارویی انجام شود. جهرمی در سال ۲۰۱۸ مشاهده نمود که از ۴۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزا ۱۲ جدایه مقاومت چنددارویی داشته‌اند (۲۱). گویتور و رایت در سال ۲۰۱۸ بیشترین حساسیت آنتی‌بیوتیکی را در بین سودوموناس آئروژینوزاها به توبرامایسین و مروپنوم (۲۲)، السید زکی و همکاران در سال ۲۰۱۷ در مصر به جنتامایسین، سفتازیدیم، آزترونام و آمیکاسین (۲۳) و جمالی و همکاران در سال ۲۰۱۵ در هند به سفوکسیتین ۸/۹۱٪، آمیکاسین ۷۲/۲٪ و جنتامایسین ۶۸/۵٪ نسبت داده‌اند (۲۴). با مقایسه نتایج این پژوهش و سایر مطالعات مشخص می‌شود برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها همچون آزترونام، تیکارسیلین و پیراسیلین همچون گذشته تاثیر چندانی ندارند.

بسیاری از نانوذرات، مانند نانوذرات طلا (AuNPs)، نشان داده‌اند که می‌توانند اثرات ضد میکروبی خوبی داشته باشند. این نانوذرات با انتشار یون‌های فلزی و تولید اکسیژن فعال (ROS) باعث ایجاد اختلال در عملکرد غشای سلولی، دیواره سلولی و آسیب به DNA می‌شوند. در این تحقیق میزان MIC نانوذرات طلا با توجه به پاسخ متفاوت جدایه‌ها، حداکثر ۵۰ محاسبه گردید. در سال ۲۰۱۸ MIC نانوذرات طلا به منظور ممانعت از تشکیل بیوفیلم توسط سینگ به میزان ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۲۵)، در سال ۲۰۱۹ توسط خان و همکاران به میزان ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۲۶) و در سال ۲۰۲۰ توسط علی و همکاران ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تشخیص داده شد (۵). همچنین در تحقیقی که توسط خار و همکاران در سال ۲۰۲۱ انجام شد، مشاهده شد در صورتی که ترکیباتی همچون امبلین و کیتوزال به همراه نانوذره طلا استفاده گردد میزان MIC نانو ذره طلا کاهش خواهد یافت (۲۷).

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حوزه معاونت پژوهشی و همکاری صمیمی کارکنان آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم تشکر می‌کنند.

### تعارض در منافع

وجود ندارد.

### ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

## References

1. Tillotson GS, Zinner SH. Burden of antimicrobial resistance in an era of decreasing susceptibility. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2017; 15:663–676
2. TorresMR, Slate AJ, Ryder SF, Akram M, Iruzubieta3 CJC, Whitehead KA. Ionic gold demonstrates antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* strains due to cellular ultrastructure damage. *Archives of Microbiology*. 2021;203:3015–3024
3. Li X, Robinson SM, Gupta A. Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multidrug-resistant bacteria. *ACS Nano*. 2014; 8(10): 10682–10686
4. Dreier J and Ruggerone P. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*. 2015;8(660):1-21
5. Ali SG, Ansari MZ, Alzohairy MA. Biogenic gold nanoparticles as potent antibacterial and antibiofilm nano-antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*. 2020;9(100): 1-13
6. Cao Q. *Haemophilus parasuis* CpxRA two-component system confers bacterial tolerance to environmental stresses and macrolide resistance. *Microbiol Research*. 2018; 206:177–185
7. Housseini B Issa K, Phan G, Broutin I. Functional mechanism of the efflux pumps transcription regulators from *Pseudomonas aeruginosa* based on 3D structures. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2018; 5(57):1-20.
8. Fernando D, Kumar A. Resistance-nodulation-division multidrug efflux pumps in gram-negative bacteria: role in virulence. *Antibiotics*. 2013; 2(1):163–181
9. Hasani A, MadhiM, Gholizadeh P. Metal nanoparticles and consequences on multi-drug resistant bacteria: reviving their role. *SN Applied Sciences*. 2019;1(360): 1-13



10. Fernandez L, and Hancock RE. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012; 25: 661–681
11. Ding F, Songkiatisak P, Cherukuri PK, Huang T, Xu XHN. Size-dependent inhibitory effects of antibiotic drug nanocarriers against *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Omega*. 2018; 3: 1231–1243
12. Skwarecki AS, Milewski S, Schielmann M, Milewska MJ. Antimicrobial molecular nanocarrier-drug conjugates. *Nanomedicine*. 2016; 12: 2215–2240
13. Pelgrift RY, Friedman AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013; 65(13): 1803–1815
14. Imlay JA. Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. *Current Opinion in Microbiology*. 2015; 24: 124–131
15. Ashraf S, Pelaz B, del Pino P. Gold-based nanomaterials for applications in nanomedicine. *Topics in Current Chemistry*. 2016; 370: 169–202
16. Jiang X, and Jia Y. Adjust the surface modification of gold nanoparticles to adjust their antibacterial properties. *the Chinese Chemical Society Conference*. 2016; pp: 142-143
17. Su C, Huang K, Li HH, Lu YG, Zheng DL. Antibacterial properties of functionalized gold nanoparticles and their application in oral biology. *Journal of Nanomaterials*. 2020; pp: 1-13
18. Clifford R, Milillo M, Prestwood J. Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by Real-Time PCR. *Plos One*. 2012; 7(11): 1-6
19. Aghamollaei H, Moghaddam MM, Kooshki H, Heiat M, Mirnejad R, Barzi NS. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* by a triplex polymerase chain reaction assay based on *lasI/R* and *gyrB* genes. *Journal of Infection and Public Health*. 2015; 8(4): 314-322
20. Weinstein M.P. Lewis JS. Bobenchik AM, et al. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 2020; pp: 42-45
21. Izadi Pour Jahromi S, Mardaneh J, Sharifi A, Pezeshkpour V, Behzad-Behbahani A, Seyyedi N, Dehbidi GR, Manzouri L, Pourmasoudi M, Khoramrooz SS. Occurrence of a multidrug resistant *pseudomonas aeruginosa* strains in hospitalized patients in southwest of Iran: Characterization of resistance trends and virulence determinants. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2018; pp: 1-11
22. Guitor AK, Wright GD. Antimicrobial Resistance and Respiratory Infections. *Chest*. 2018; 154: 1202–1212
23. El Sayed Zaki M, Elewa A, Al-Kasaby NM. Molecular study of efflux genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2017; 6(7): 4549-4556

24. Jamali S, Shahid M, Farrukh S, Singh A, Khan HM. Molecular characterization of genes encoding AmpC beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;5: 048–051
25. Singh P, Pandit S, Beshay M, Mokka pati VRSS. Anti-biofilm effects of gold and silver nanoparticles synthesized by the *Rhodiolarosea* rhizome extracts. *Artificial cells, nanomedicine and Biotechnology*. 2018;pp:1-14
26. Khan F, Manivasagan P, Lee JW, Pham DTN, Oh J, Kim YM. Fucoidan-stabilized gold nanoparticle-mediated biofilm inhibition, attenuation of virulence and motility properties in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Marine drugs*. 2019;pp: 1-19
27. Khare T, Mahalunkar S, Shriram V, Gosavi S, Kumar V. Embelin-loaded chitosan gold nanoparticles interact synergistically with ciprofloxacin by inhibiting efflux pumps in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Environmental Research*. 2021; 199:1-12
28. Ahmed FY, Aly UF, Abd El-Baky RM, Waly NGFM. Effect of titanium dioxide nanoparticles on the expression of efflux pump and quorum-sensing genes in MDR *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antibiotics*. 2021; 10(625):1-15
29. Sharif R, and 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 [ in Persian ]
30. Abdolhosseini M, Zamani H, Salehzadeh A. Synergistic antimicrobial potential of ciprofloxacin with silver nanoparticles conjugated to thiosemicarbazide against ciprofloxacin resistant *Pseudomonas aeruginosa* by attenuation of MexA-B efflux pump genes. *Biologia*. 2019; pp: 1-6
31. Dashtizadeh Y, Moattari A, Gorzin AA. Phenotypic and genetically evaluation of the prevalence of efflux pumps and antibiotic resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* among burned patients admitted to Ghotbod in Shirazi Hospital. *Journal of Microbial World*. 2014; 4(2): 118-127 [ in Persian ]