Original Article

مجله دنیای میکروب ها
سال سوم، شماره دوم (پیاپی ۷)، تابستان ۱۳۸۹
صفحات ۱۰۰-۸۴

اثر مهاری کانجوگه داکسی‌سیکلین و نانوذرات نقره بر باکتری بروسلا ملی تنسیس

محسن اجلی[۱]، مجتبی صلوتی[۲]، حامد علیزاده*[۳]، زهرا حیدری[۱]، حسین حمزه‌ای[۱]، آرام علیزاده[۱]

[۱]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، گروه میکروبیولوژی، [۲]دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، مرکز تحقیقات بیولوژی
[۳]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، باشگاه پژوهشگران جوان

چکیده

سابقه و هدف: بروسلوزیس یک بیماری مشترک بین انسان و حیوان است که توسط جنس بروسلاایجاد می‌شود. در مطالعات اخیر فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره به اثبات رسیده است. هدف از این پژوهش، بررسی اثرات ضدمیکروبی و اثر هم افزایی کونژوگه داکسی‌سیکلین و نانوذرات نقره بر روی بروسلا ملی تنسیس 16M بود.

مواد و روش‌ها: در ابتدا کونژوگه داکسی‌سیکلین و نانوذرات نقره تهیه شد. سپس با روش انتشار چاهک اثر مهارکنندگی آن بر روی بروسلا ملی تنسیس 16M در محیط مولر هینتون آگار مورد بررسی قرار گرفت. همچنین با استفاده از روش ماکرودیلوشن حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده باکتری (MBC) توسط کونژوگه داکسی سیکلین و نانوذره نقره در محیط مولر هینتون براث تعیین گردید. در نهایت در مدل حیوانی نیز اثر کونژوگه سنتز شده مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که کونژوگه داکسی‌سیکلین و نانوذرات نقره اثر ضدمیکروبی روی باکتری بروسلا ملی‌تنسیس 16M در شرایط آزمایشگاهی دارد. در مدل حیوانی کونژوگه نانوذرات نقره و داکسی‌سیکلین کاهش زیادی در میزان باکتری‌های بروسلا ملی تنسیس طحالی ایجاد کرد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که کونژوگه داکسی‌سیکلین و نانوذرات نقره اثر هم افزایی بر روی هم دارند و می‌تواند در درمان بروسلوز مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: اثر ضدمیکروبی، نانو ذرات نقره، داکسی‌سیکلین، بروسلا

دریافت مقاله: بهمن ۱۳۸۸ پذیرش برای چاپ: فروردین ۱۳۸۹

مقدمه

بروسلوز بیماری عفونی است که توسط گونه‌های بروسلا (*Brucella*) در حیوانات و انسان ایجاد می‌شود. این بیماری معمولاً از طریق حیوانات به انسان انتقال می‌یابد (۱). بیشترین موارد بروسلوز انسانی توسط بروسلاملی تنسیس و بروسلا آبورتوس ایجاد می‌گردد. با وجود پیشرفت‌های اخیر در زمینه بهداشت و درمان اما بروسلوز هنوز به عنوان یک مشکل اساسی در اکثر کشورهای جهان مطرح است. به طوری که این بیماری در بسیاری از مناطق جهان از جمله کشورهای خاورمیانه، بخش‌هایی از آفریقا و آمریکای جنوبی، آسیای مرکزی و ایران به صورت اندمیک باقی مانده است. در گذشته درمان تک دارویی بروسلوز همواره ناکافی بوده است تا جایی که معمولاً پس از درمان، عود مجدد بیماری مشاهده می‌شد. به همین دلیل امروزه برای درمان

*) آدرس برای مکاتبه: زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، باشگاه پژوهشگران جوان
تلفن: ۰۹۱۴۹۱۰۲۲۱۷
پست الکترونیک: Hamedalizadeh1986@yahoo.com

بروسلوز از درمان دو دارویی داکسی‌سیکلین به همراه ریفامپین یا داکسی‌سیکلین به همراه جنتامایسین استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر، بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی بسیار افزایش یافته است که خود مشکلات زیادی را در زمینه درمان بیماری‌های عفونی ایجاد کرده است. با توجه به اهمیت این موضوع، سازمان بهداشت جهانی سال ۲۰۱۱ را به عنوان سال مقابله با مقاومت‌های میکروبی نام‌گذاری کرده بود (۲). با توجه به موارد ذکر شده در مورد شیوع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، سازمان بهداشت جهانی یافتن روش درمانی جدید و جایگزین نمودن آن در درمان بروسلوز را در جزء اولویت‌های اصلی خود قرار داده است (۳). مطالعات اخیر در سرتاسر دنیا نشان داده است که علاوه بر درمان‌های آنتی‌بیوتیکی، نانوذرات نقره نیز اثر ضدباکتریایی قابل توجهی بر روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارند (۱۲). همچنین مشخص شده است که تجمع ذرات نقره در محیط آبی اکسیژن‌دار، باعث تخریب و ایجاد اختلال در اکسیداسیون میکروارگانیسم‌ها می‌گردد (۲).

این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات ضدمیکروبی و اثر هم‌افزایی کونژوگه داکسی‌سیکلین و نانوذرات نقره بر روی بروسلاملی‌تنسیس 16M در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی انجام گردیده تا روشی نوین در درمان بروسلوز را مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

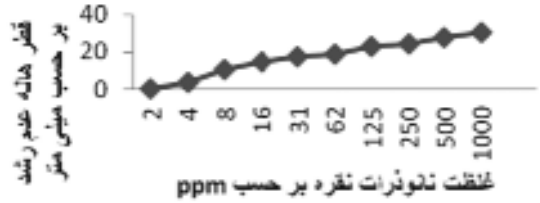
الف) مواد مورد پژوهش: سویه باکتریایی بروسلاملی‌تنسیس 16M از بانک میکروبی مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان تهیه گردید. موش‌های سوری ماده ۸-۶ هفته‌ای از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. نانوذرات نقره با اندازه‌ی ۱۸-۳ نانومتر با نام تجاری Nanocolloid از شرکت نانوسید (NANOCID) تهیه شد. تمامی محیط‌های کشت مورد استفاده از شرکت مرک آلمان و پودر داکسی سیکلین از شرکت سیگما آمریکا خریداری شدند.

ب) کونژوگه داکسی سیکلین و نانو ذرات نقره: در این مطالعه از روش فیشر و همکاران برای کونژوگاسیون استفاده گردید (۴). بدین منظور ابتدا آنتی بیوتیک داکسی سیکلین (در غلظت‌های ۰/۵ تا ۱۶ میکرو گرم) و ppm۱۰۰۰-۲ نانوذرات نقره در آب دیونیزه شده مخلوط گردیدند. سپس برای فعال سازی واکنش بین گروه کربوکسیل نانو ذرات نقره و گروه آمینی آنتی بیوتیک از EDAC (ان ـ۳ـدی متیل آمینو پروپیل ـ ان ـ اتیل کربو دایمید هیدرو کلراید) استفاده شد. ترکیب حاصل در دمای اتاق به مدت ۱۶ ساعت مخلوط گردید. برای تأیید کونژوگه داکسی سیکلین و نانوذرات نقره، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر GENESYS 5 336001، طیف جذبی ترکیب حاصل در طول موج ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر با طیف جذبی هر یک از مواد به تنهایی اندازه‌گیری و مقایسه گردید (۴).

ج) بررسی اثر ضدباکتریایی کونژوگه داکسی سیکلین و نانو ذرات نقره با روش انتشار در چاهک: پس از کشت باکتری بروسلا ملی تنسیس16M بر روی محیط بروسلا آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در حضور ۷-۵ درصد CO_2، سوسپانسیون باکتریایی با کدورت معادل لوله نیم مک فارلند در نرمال سالین استریل تهیه گردید. پلیت های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار به ضخامت ۱±۵ میلی متر آماده و چاهک هایی به قطر تقریبی ۶ میلی متر در وسط هر کدام از آن‌ها حفر شد. مقداری از سوسپانسیون میکروبی توسط سوآپ استریل برداشته و در سه جهت بر روی پلیت های مذکور کشت داده شدند. سپس به هر یک از چاهک‌ها ۸۰ میکرولیتر از رقت‌های ۱ :۱۰، ۱ :۲۰ تا ۱ :۲۵۶۰ نانوذرات نقره، غلظت‌های ۰/۵ تا ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داکسی‌سیکلین و به‌طور هم زمان رقت‌های ۱ :۱۰، ۱ :۲۰ تا ۱ :۲۵۶۰ نانوذرات نقره به همراه غلظت‌های ۰/۵ تا ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر داکسی‌سیکلین که توسط روش فیشر کونژوگه شده بود، اضافه گردید. پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به همراه ۷-۵ درصد CO_2 به مدت۷۲ ساعت انکوبه شدند. در نهایت هاله عدم رشد باکتری در اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری گردید. جهت کاهش خطا این کار سه بار تکرار شد (۵ و ۶).

د) تعیین MIC و MBC: به منظور تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده باکتری (MBC) توسط نانوذرات نقره از روش Broth Dilution استفاده شد. به طور خلاصه ۲۵۰ میکرولیتر از نانوذرات نقره با غلظت ppm ۴۰۰۰ و ۷۵۰ میکرولیتر از محیط مولر هینتون براث دوبل به لوله آزمایش

نمودار ۱: اثر غلظت‌های مختلف داکسی‌سیکلین بر قطر هاله عدم رشد بروسلا در محیط آگاردار.



نمودار ۲: اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر قطر هاله عدم رشد بروسلا در محیط آگاردار.

استریل اضافه گردید. سپس در هر مرحله محتویات لوله آزمایش دوم تا دهم به صورت رقت‌های متوالی با محیط مولر هینتون براث دو برابر رقیق شدند. سپس ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی ۰/۵ مک‌فارلند به آن اضافه گردید. در یک ارلن استریل ۳۲ میلی‌گرم از پودر داکسی‌سیکلین ریخته و با محیط کشت مولر هینتون براث دوبل به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. ۱ میلی‌لیتر از محتویات ارلن برداشته و به ۱ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث دو برابر موجود در لوله آزمایش دوم اضافه گردید. سپس ۱ میلی‌لیتر از محصول حاصل را به لوله سوم اضافه کرده و رقیق سازی تا لوله هشتم ادامه یافت. سپس ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی با کدورت ۰/۵ مک فارلند به آن ها اضافه گردید. لوله های آماده شده به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۷-۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. برای تعیین MIC، ۱۰۰ میکرولیتر از مایع داخل هر یک از لوله‌ها بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل و با استفاده از آنس استریل بر روی محیط کشت پخش گردید. پلیت‌های تهیه شده به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور با شرایط مذکور انکوبه شدند. اولین لوله از غلظت‌های پایین کونژوگه داکسی‌سیکلین و نانوذرات نقره‌که فاقدکدورت ناشی از رشد باکتری بود به عنوان غلظت MIC و اولین لوله از غلظت‌های نانوذرات نقره‌که در آن‌ها ۹۹/۹٪ از مقدار اولیه باکتری‌های اضافه شده از بین رفته و در کشت مجدد تنها ۰/۱٪ از باکتری‌ها رشدکرده بودند به عنوان غلظت MBC برای نانوذرات نقره محاسبه گردید. تمام مراحل یاد شده با ۳ تکرار انجام گردید (۹-۵).

ه) اثر ضدمیکروبی کونژوگه داکسی‌سیکلین و نانوذرات نقره در مدل حیوانی: در این مطالعه از ۲۰ موش سوری ماده بالغ ۸-۶ هفته‌ای با وزن تقریبی ۵± ۲۵ گرم استفاده شد. موش‌ها به ۴ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه اول با نانوذرات نقره، گروه دوم با داکسی‌سیکلین، گروه سوم با بهترین کونژوگه نانوذرات نقره و داکسی‌سیکلین حاصل در شرایط آزمایشگاهی و گروه ۴ به عنوان گروه کنترل با نرمال سالین استریل تیمار شدند. در روز اول به هر گروه، باکتری بروسلا به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. در روز بعد ۰/۵ میلی‌لیتر از تیمارهای مذکور به صورت داخل صفاقی تزریق شد. پس از ۷ روز، موش‌ها با بی‌هوشی کشته شدند. طحال حیوانات در شرایط استریل خارج گردید و در ۱۰ میلی‌لیتر فسفات بافر سالین استریل هموژنیزه گردید. سپس از سوسپانسیون هموژنیزه طحالی بر روی محیط مولر هینتون آگارکشت داده شد. پلیت‌های تهیه شده در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۷-۵ درصد CO_2 به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از آن شمارش کلنی‌های بروسلا انجام گردید (۱۰).

و) آنالیز آماری داده‌ها: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نسخه هجدهم نرم‌افزار SPSS (IBM, SPSS statistics, Chicago, IL, USA) و آزمون آماری کروسکال والیس انجام گرفت. مرز معنی‌داری روی $P<0/05$ قرار داده شد.

یافته‌ها

الف) انتشار در چاهک: نتایج ارزیابی روش انتشار در چاهک در محیط دارای آگار نشان دادکه با افزایش غلظت کونژوگه نانوذره نقره و داکسی سیکلین در درون چاهک‌ها، قطر هاله عدم رشد باکتری بروسلاملی تنسیس 16M بیشتر شده است. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری در غلظت های مختلف ترکیبات مورد بررسی در نمودارهای ۱ تا ۳ نشان داده شده است.

ب) نتایج تعیین MIC و MBC: میزان MIC کونژوگه داکسی

نمودار ۳: اثر غلظت‌های مختلف کونژوگه داکسی‌سیکلین و نانوذرات نقره بر قطر هاله عدم رشد بروسلا.

سیکلین و نانوذرات نقره بر بروسلاملی تنسیس M16 به ترتیب، در غلظت نانوذرات نقره ۸ppm، داکسی سیکلین ۴μg/ml و میزان MBC در غلظت نانوذرات نقره ۱۶ppm، داکسی سیکلین ۸μg/ml می‌باشد. میزان MIC و MBC نانو ذرات نقره بر روی باکتری مذکور به ترتیب ۱۶ppm و ۳۱ppm و میزان MIC و MBC داکسی سیکلین بر روی باکتری مذکور به ترتیب ۸μg/ml و ۱۶μg/ml گزارش گردید. نتایج نشان داد که اختلاف معنی داری بین میزان MIC و MBC کونژوگه داکسی سیکلین و نانوذرات نقره برای باکتری‌های مذکور وجود دارد ($p<۰/۰۵$).

ج) نتایج مدل حیوانی: ۷۲ ساعت پس از کشت سوسپانسیون هموژنیزه طحالی بر روی محیط مولر هینتون آگار، میانگین تعداد باکتری های رشد کرده محاسبه گردید. میانگین باکتری های رشد کرده در حضور کونژوگه داکسی سیکلین نانوذرات نقره ۴۵ بود. در حالی که تعداد باکتری در حضور نانوذرات نقره، داکسی سیکلین و گروه کنترل به ترتیب ۵۲۱، $۱۰^{۵}$ × ۱۸ و $۱۰^{۱۰}$ × ۳ گزارش گردید. با توجه به نتایج مشخص گردید که در مدل حیوانی اثر مهار کنندگی کونژوگه داکسی‌سیکلین نانوذرات نقره، بیشتر از نانوذرات نقره و یا داکسی‌سیکلین به تنهایی بوده است. آنالیز آماری نتایج به دست آمده نشان داد که اختلاف معنی داری بین گروه‌های آزمون و گروه کنترل وجود دارد ($p<۰/۰۵$).

بحث

در مطالعه حاضر اثرات ضدمیکروبی و اثر هم‌افزایی کونژوگه داکسی‌سیکلین و نانوذرات نقره بر روی بروسلاملی تنسیس 16M در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی مورد ارزیابی قرار گرفت. در درمان بروسلوزیس سه نکته اساسی باید مد نظر قرار گیرد. ابتدا باید میزان کافی آنتی‌بیوتیک به درون سلول هدف بروسلا برسد. دوم ترکیب دارویی که استفاده می‌شود باید اثر هم‌افزایی کافی برای تأثیر را داشته باشد و سوم حساسیت به آن آنتی‌بیوتیک در شرایط In Vitro ثابت شود (۱۱).

روش انتشار در چاهک در محیط دارای آگار به منظور وابستگی بین اثر ضدمیکروبی و دوز مصرفی آن ماده ضدمیکروبی انجام می‌شود. در مطالعه حاضر، مشاهده شد که با افزایش غلظت کونژوگه داکسی‌سیکلین و نانوذره نقره قطر هاله عدم رشد باکتری افزایش یافت. بنابراین به نظر می‌رسد که اثر ضدمیکروبی کونژوگه داکسی‌سیکلین و نانوذرات نقره، وابسته به دوز مصرفی آن می‌باشد. علیزاده (Alizadeh) و همکاران در سال ۱۳۹۰ اثر باکتریوسایدی نانوذرات نقره را در برابر باکتری‌های بروسلا مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آن‌ها اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره علیه باکتری مورد مطالعه را نشان داد. همچنین پژوهشگران یاد شده نشان دادند که فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره وابسته به دوز مصرفی آن می‌باشد (۱۱). نیلدا (Nilda) و همکاران نیز در مکزیک به نتایج مشابهی دست پیدا کردند که با یافته‌های آن‌ها مطابقت دارد (۱۲).

نتایج تعیین MIC و MBC کونژوگه داکسی‌سیکلین و نانوذرات نقره با روش ماکرودیلوشن در محیط کشت مولر هینتون براث نشان داد که MIC بروسلاملی تنسیس 16M در محدوده ۸ppm غلظت نانوذرات نقره و ۴μg/ml داکسی‌سیکلین و میزان MBC در غلظت ۱۶ppm نانوذرات نقره و ۸μg/ml داکسی‌سیکلین می‌باشد. در سال ۲۰۰۵ کیونگ (Kyung) و همکارانش اثرات ضدمیکروبی نانوذرات نقره را بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی مطالعه نمودند (۱۳). نانوذرات نقره مورد استفاده آن‌ها کلوئیدی، کروی با میانگین قطر ۱۰nm بود. آن ها در این مطالعه میزان MIC نانوذرات نقره را در محدوده ۱۰-۵ppm تعیین کردند که با نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد.

آرونا (Aruna) و همکارانش در سال ۲۰۱۰ اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره را در محیط‌های کشت جامد و مایع بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا مطالعه نمودند. نانوذرات نقره مورد استفاده آن‌ها کروی نبود و توسط محققان از نمک‌های نقره سنتز شده بود.

نتایج آن‌ها نشان داد که نانوذرات نقره در غلظت‌های پایین تر از ۱ میکروگرم در لیتر اثر ضدمیکروبی دارند (۱۴). در سال ۱۹۸۷ محمد (Mohammad) و همکارانش اتصال نانوذرات پلی آلکیل سیانوآکریلات و آمپی‌سیلین را برای درمان عفونت‌های ناشی از لیستریا مونوسیتوژنز در موش بررسی کردند. یافته‌های آن‌ها نشان داد که کمپلکس تولید شده می‌تواند موجب کنترل عفونت‌های ناشی از این باکتری شود. همچنین آن‌ها گزارش کردند که غلظت ۴/۲ میلی‌گرم آمپی‌سیلین متصل به نانوذرات پلی آلکیل سیانوآکریلات نسبت به غلظت ۴۸ میلی‌گرم آمپی‌سیلین آزاد اثر به مراتب بیشتری در کنترل عفونت‌های ناشی از لیستریا مونوسیتوژنز دارد (۱۵). در مطالعه حاضر نیز اثر هم افزایی شدیدی بین داکسی سیکلین و نانوذرات نقره مشاهده شد که با نتایج حاصل از این پژوهشگران مطابقت دارد.

هامبرتو (Humberto) و همکارانش در سال ۲۰۱۰ اثر مهاری نانودرات نقره را بر روی باکتری‌هایی که مقاومت‌های دارویی زیادی از خود نشان می‌دهند مانند سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیاکلی مقاوم به آمپی‌سیلین، استرپتوکوکوس پایوژنز مقاوم به اریترومایسین، مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها مشاهده کردند که نانوذرات نقره اثر باکتریوستاتیک قابل ملاحظه‌ای بر روی این باکتری‌ها دارند (۱۶).

پینگ (Ping) و همکارانش در سال ۲۰۰۵ با اتصال نانوذرات نقره به ترکیبات بتا ـ لاکتام دریافتند که این کمپلکس اثرات آنتی‌باکتریال بیشتری نسبت به ترکیبات بتا ـ لاکتام به تنهایی دارند (۱۷). در پژوهش یاد شده اتصال نانوذرات نقره با آموکسی‌سیلین باعث افزایش اثر درمانی این کمپلکس بر روی باکتری اشریشیاکلی شده بود که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. شاهوردی (Shahverdi) و همکاران در سال ۲۰۰۷، نانوذرات نقره را از مایع رویی محیط کشت باکتری کلبسیلا نمونیه سنتز و اثرات ضدباکتریایی آن را بر روی باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه نمودند. آن‌ها در این ارزیابی اثرات ضدباکتریایی این ترکیب را تأیید نمودند. همچنین آن‌ها اثر هم افزایی نانوذرات نقره سنتز شده را با آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین G، آموکسی‌سیلین، اریترومایسین، کلیندامایسین و ونکومایسین بررسی و دریافتند که نانوذرات نقره، اثر هم‌افزایی زیادی با آنتی‌بیوتیک‌های یاد شده دارد (۱۸).

در مطالعه حاضر بررسی اثرات ضدمیکروبی نانوذرات نقره در مدل حیوانی در موش‌های ماده مشخص نمود که اختلاف معنی داری بین گروه‌های آزمون و گروه کنترل وجود دارد. به طوری که میانگین باکتری‌های رشد کرده در گروه تیمار شده با کونژوگه داکسی‌سیکلین و نانوذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل (تیمار شده با نرمال سالین) و نیز سایر گروه‌ها، کم‌تر بوده است. لذا با توجه به نتایج آورده شده می‌توان به اثر هم‌افزایی شدید کونژوگه نانوذرات نقره و داکسی سیکلین پی برد. یافته‌های به دست آمده در این مطالعه با نتایج محمد (Mohamed) و همکارانش در سال ۲۰۰۹ مطابقت دارد. آن‌ها در مطالعه‌ای نشان دادند که تعداد کلنی‌های باکتری سالمونلا انتریکا در طحال و کبد موش در صورت تزریق نانوذرات سیلیکا کونژوگه شده با جنتامایسین در مقایسه با زمانی که تنها جنتامایسین آزاد به طحال و کبد موش تزریق می شود، کم‌تر است (۱۹). همچنین علیزاده (Alizadeh) و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر هم افزایی نانوذرات نقره با جنتامایسین را در مدل حیوانی مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها در این مطالعه آنتی‌بیوتیک جنتامایسین را به نانوذرات نقره کونژوگه نکرده بودند بلکه اثر آن‌ها را به صورت توام در مدل حیوانی مورد آزمایش قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که نانوذرات نقره اثر هم‌افزایی شدیدی با جنتامایسین دارد (۱۱).

نتیجه گیری

با توجه به یافته‌های به دست آمده در این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که کونژوگه نانوذرات نقره با داکسی‌سیکلین هم در شرایط برون تن (in vitro) و هم در شرایط درون تن (in vivo) دارای فعالیت ضدمیکروبی و باکتری کشی علیه بروسلا می‌باشند. اما به تنهایی این اثر را نداشتند. بنابراین با توجه به افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی استفاده از کونژوگه نانوذرات نقره با داکسی‌سیکلین می‌تواند جایگزین مناسبی در درمان بیماری بروسلوزیس باشد. همچنین با این روش می‌توان میزان دوز مصرفی آنتی‌بیوتیک را نیز به شدت کاهش داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل مرکز تحقیقات بیولوژی و معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Rad MA. Brucellosis, Zoonosis disease. 1st edition. University of Tehran Publication. Tehran. 2009; 94-101. [In persian].
2. Ohishi K, Zenitani R, Bando T, Goto Y, Uchida K, Maruyama T, Yamamoto S, Miyazaki N, Fujise Y. Pathological and serological evidence of *Brucella*-infection in baleen whales (Mysticeti) in the western North Pacific. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2003; 26: 125-136.
3. Covert J, Eskra L, Splitter G. Isolation of *Brucella abortus* total RNA from *B. abortus*-infected murine RAW macrophages. J Microbiol Methods. 2005; 60(3): 383-393.
4. Fischer NO, Verma, A, Goodman CM, Simard JM, Rotello VM. Reversible "irreversible" inhibition of chymotrypsin using nanoparticle receptors. J Am Chem. 2003; 125(44): 13387-13391.
5. Collee JG, Miles RS. Tests for identification of bacteria. In: Collee JG, Duguid JP, Fraser AG, Marmion BP. Mackie And Mccartney Practical Medical Microbiology, 13th Ed. Vol. 2, New York: Churchill Livingstone. 1989; 525-530.
6. Mohsen Nezhad F, Zeigham H, Mota A, Sattari M, Yadegar A . Antibacterial activity of *Eucalyptus* extracts on methicillin resistance *Staphylococcus aureus.* Res J Biol Sci. 2009; 4(8): 905-908.
7. Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. J Ethnopharmacol. 2001; 74(2): 113-123.
8. Ersoy Y, Sonmez E, Tevfik MR, But AD. Comparison of three different combination therapies in the treatment of human brucellosis. Trop Doct. 2005; 35(4): 210-212.
9. Trujillano -Martin I, Garcia-Sanchez E, Fresnadillo MJ, Garcia-Sanchez JE, Garcia-Rodriguez JA, Montez-Martinez I. In vitro activities of five new antimicrobial agents againts *Brucella melitensis*. Int J Antimicrob Agents. 1999; 12(2): 185-186.
10. Naeini A, Khosravi A, Tadjbakhsh H, Ghazanfari T, Yaraee R, Shokri H. Evaluation of the immunostimulatory activity of *Ziziphora tenuior* extracts. Comp Clin Pathol. 2010; 19(5): 459-463.
11. Alizadeh H, 2011, Study of antimicrobial effects of silver nanoparticles on *Brucella abortus* 544 and *Brucella melitensis* 16M in in vitro, cell culture and animal model. Faculty of basic and medical science, Islamic Azad University, Zanjan branch. [In persian].
12. Ayala-Nunez NV, Lara HH, Ixtepan-Turrent L, Rodriguez-Padilla C. Silver nanoparticles toxicity and bacterial effect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Nanobiotechnol. 2009; 5: 2-9.
13. Cho KH, Park JE, Osaka T, Park SG. The study of antimicrobial activity and preservation effects of nanosilver ingrediant. Electrochimica Acta. 2005; 51(5): 956-960.
14. Kora AJ, Arunachalam J. Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanism of action. World J Microbiol Biotechnol. 2011; 27(5): 1209-1216.
15. Yussef M, Fattal E, Alonso MJ, Roblot-Treupel L, Sauzieres J, Tancrede C, Omnes A, Couvreur P, Andremont A. Effectiveness of nanoparticle-bound ampicillin in the treatment of *Listeria monocytogenes* infection in athymic nude mice. Antimicrob Agents Chemother. 1988; 32(8): 1204-1207.
16. Ayala-Nunez NV, Lara HH, Ixtepan-Turrent L, Rodriguez-Padilla C. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. World J Microbiol Biotechnol. 2010; 26: 615-621.
17. Li P, Li J, Wu C, Wu Q, Li J. Synergistic antibacterial effects of β-lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. J Nanotechnol. 2005; 16(9): 1912-1917.
18. Shahverdi AR, Fakhimi A, Shahverdi HR, Minaian S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli.* Nanomedicine. 2007; 3 (2): 168-171.
19. Seleem MN, Munusamy P, Ranjan A, Alqublan H, Pickrell G, Sriranganathan N. Silica-antibiotic hybrid nanoparticles for targeting intracellular pathogens. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(10): 4270-4274.

Journal of Microbial World
Volume 3, No. 2, June 2010

The Inhibitory Effect of Doxycycline- Silver Nanoparticle Conjugate on *Brucella melitensis*

Mohsen Ajalli[1], Mojtaba Salouti[2], Hamed Alizadeh[3], Zahra Heydari[1], Hossein Hamzehei[1], AramAlizadeh[1]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.
[2]Associate Professor, Biology Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.
[3]M.Sc., Young Researcher's Club, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Brucellosis is a zoonotic disease caused by *Brucella* bacteria. According to recent studies, antimicrobial activity of silver nanoparticle was approved. The aim of this study was to investigate the antimicrobial activity of Doxycycline - silver nanoparticles conjugate against *Brucella meltensis* 16M.

Material and Methods: After preparing the doxycycline-silver nanoparticle conjugate, its antimicrobial activity against *Brucella meltensis* 16M was determined by Well Diffusion Agar method in Muller Hintone Agar media. Also, Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of Doxycycline-silver nanoparticle conjugate was determined by Macrodilution method in Muller Hintone Broth media. Finally, antibacterial effect of the nanoparticle was assayed in animal model.

Results: The results showed that Doxycycline-silver nanoparticle conjugate has antimicrobial activity against *Brucella melitensis* 16M in laboratory condition. In mouse model, the conjugate of Doxycycline-silver nanoparticle could decrease effectively the *Brucella melitensis* load in liver.

Conclusion: This study demonstrated that Doxycycline-silver nanoparticle conjugate has synergistic effect on *Brucella melitensis* 16M and can be useful in treatment of brucellosis.

Keyword: Antimicrobial effect, Silver Nanoparticles, Doxycycline, *Brucella*.

Correspondence to: Hamed Alizadeh
Tel: +989149102217
E-mail: Hamedalizadeh1986@yahoo.com
Journal of Microbial World, 2010 3(2):84-100