بررسی مقایسه‌ای اثر آنتی‌بیوفیلم نانوذرات نقره و آنتی‌بیوتیک جنتامیسین بر بیوفیلم شکل گرفته توسط ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس

زهرا عاطفی[1]، نادیا کاظمی‌پور[2]*

۱-کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

یافته / دوره ۲۶ / شماره ۱ / بهار ۱۴۰۳ / مسلسل ۹۹

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۵/۸ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۱/۲۵

مقدمه: *استافیلوکوکوس اورئوس* از دسته پاتوژن‌های فرصت طلب است که در عفونت‌های بیمارستانی نقش دارد. با توجه به توانایی تولید بیوفیلم توسط این باکتری، مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن افزایش یافته است. نانوذرات نقره با توجه به اندازه کوچکشان، توانایی نفوذ به سلول‌های باکتری و از بین بردن بیوفیلم باکتری را دارند. هدف بررسی اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره و جنتامیسین بر *استافیلوکوکوس اورئوس* بالینی است.

مواد و روش‌ها: ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از مراکز بهداشتی شهر کرمان جمع‌آوری و توسط آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها بررسی و در ادامه MIC جدایه‌ها توسط جنتامیسین و نانوذرات نقره بررسی شد. ایزوله‌های باکتریایی در مقابل غلظت MIC ۲، MIC، MIC ۱/۲ و MIC ۱/۴ از جنتامیسین و نانوذرات نقره به طور جداگانه قرار گرفتند و نتایج با یکدیگر مقایسه شدند.

یافته‌ها: ۱۰۰ درصد ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های اگزاسیلین و پنی‌سیلین، ۶۳/۳۳ درصد به تتراسیکلین، ۶/۶۶ درصد به سیپروفلوکساسین و ۳/۳۳ درصد به جنتامیسین مقاوم بودند. غلظت MIC ایزوله‌ها در برابر جنتامیسین از ۶۴ تا ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و در برابر نانوذرات نقره از غلظت ppm ۱۰/۶۲ تا ppm ۵/۳۱ بود. مقایسه اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره و جنتامیسین در غلظت‌های MIC، MIC ۱/۲ و MIC ۱/۴ با یکدیگر در سطح معنی‌داری ۵درصد اختلاف معنی‌دار داشتند و اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره از جنتامیسین بهتر بود.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده، پیشنهاد می‌شود با تحقیقات بیشتر از نانوذرات نقره جهت کنترل و از بین بردن بیوفیلم‌های شکل گرفته شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* بهره برد.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، نانوذرات نقره، بیوفیلم، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، جنتامیسین.

*آدرس مکاتبه: کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، گروه میکروبیولوژی.

پست الکترونیک: nadia_kazemi@yahoo.com

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) باکتری گرم مثبت، خوشه‌ای و کروی شکل است که یک پاتوژن انسانی و حیوانی از خانواده استافیلوکوکاسه‌آ و سرده استافیلوکوکوس است. این باکتری می‌تواند باعث عفونت‌های پوستی مانند زرد زخم، سوختگی پوست، جوش، کورک، آبسه و غیره شود، همچنین باعث بیماری‌های تهدیدکننده زندگی مانند منتژیت، پنومونی، اندوکاردیت، باکتریمی و سپسیس می‌شود (۱). *استافیلوکوکوس اورئوس* به واسطه تشکیل بیوفیلم، توانایی چسبیدن به سطوح و در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در کلنی‌های خود نقش دارد. بیوفیلم اولین بار توسط آنتونی‌وان لیون‌هوک توصیف شد. فعالیت‌های باکتریایی مختلف می‌توانند بر ساختار و ویژگی‌های بیوفیلم تاثیر بگذارند، از جمله این فعالیت‌ها می‌توان به رشد یا مرگ سلولی، جذب مواد مغذی، تجمع مواد زائد، مکانیسم‌های حرکتی و سنتز اگزوپلی‌ساکارید اشاره کرد. بیوفیلم‌ها جوامع باکتریایی را نشان می‌دهند که در ماتریکس پلیمری خارج سلولی خود تولید شده و به یک سطح متصل هستند. جمعیت میکروبی بیوفیلم می‌تواند از یک یا چند گونه باکتری تشکیل شده باشد. تشکیل بیوفیلم زمانی آغاز می‌شود که سلول‌های باکتریایی به یک سطح متصل شده و به آن بچسبند. سیگنال‌هایی که برای استقرار اولیه باکتری‌ها هستند شامل ۱) وجود یک سطح مناسب ۲) افزایش سطح آهن و فریتین خارج سلولی ۳) وجود ترکیباتی مانند اندول که تحریک تشکیل بیوفیلم در باکتری‌های گرم منفی را موجب می‌شود یا سایر مواد شیمیایی از جمله پلی‌آمین‌ها، کلسیم یا نمک‌های صفراوی می‌باشند که تشکیل بیوفیلم را در باکتری‌هایی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* را تعدیل می‌کنند (۲). به‌طور معمول جهت از بین بردن بیوفیلم‌های باکتریایی در محیط‌های زنده و غیر زنده از آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضد عفونی کننده استفاده می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌ها ابزارهای قدرتمندی در دست بشر هستند که پزشکی مدرن با کمک آنها ممکن شده است، از سوی دیگر استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌ها موجب انباشته شدن ژن‌های مقاومتی و همچنین شناسایی راه‌های جدید مقابله با آنها توسط میکروارگانیسم‌ها شده است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در پاتوژن‌های باکتریایی یک چالش محسوب می‌شود که با عوارض مرگ و میر بالا همراه است (۳). جنتامیسین به عنوان یک آنتی‌بیوتیک ضد باکتری از گروه آمینوگلیکوزید است که از سنتز پروتئین در باکتری جلوگیری می‌کند. استفاده از این آنتی‌بیوتیک به دلیل عوارض جانبی بالقوه جدی معمولا در سمیت گوش و سمیت کلیوی محدود شده است. در سال‌های اخیر مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به این گروه نیز ایجاد شده است، اضافه اینکه نیمه عمر این دارو نیز پایین است (۴). تشکیل بیوفیلم نه تنها باعث می‌شود سلول‌های باکتری از ایمنی بدن انسان فرار کنند، بلکه نفوذ آنتی‌بیوتیک را به خود نیز محدود می‌کنند. ارتباط مثبتی بین مقاومت دارویی و ایجاد بیوفیلم در جدایه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* وجود دارد. باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم تقریبا ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ بار مقاومت آنتی‌بیوتیک بالاتری نسبت به سلول‌های باکتریایی آزاد (پلانکتون) از خود نشان می‌دهند. دلایل این رخداد شامل نفوذ ضعیف آنتی‌بیوتیک‌ها به بیوفیلم، رشد کندتر باکتری‌ها، فرایندهای متابولیکی خاص و انتقال افقی آسان‌تر ژن‌ها در حالت بیوفیلم است (۵). اجزای بیوفیلم به عنوان اهدافی عالی برای درمان ضد میکروبی شناخته شده‌اند، زیرا ایجاد اختلال در بیوفیلم، سلول‌های باکتری را در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و سیستم ایمنی آسیب‌پذیرتر می‌کند. به منظور غلبه بر محدودیت‌های درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها، درمان‌های ضد میکروبی جدیدی در حال توسعه است که شامل ساخت مولکول‌های کوچک، تعدیل

کننده‌های ایمنی، عوامل ضد ویروسی، واکسن‌های آنتی‌بادی و نانوذرات فلزی است (۶). در ۱۵ سال گذشته، پژوهشگران به‌طور دقیق خواص نانوذرات را به منظور کاربردهای زیست پزشکی بررسی کرده‌اند. از جمله این نانوذرات می‌توان به نانوذرات نقره اشاره کرد. نانوذرات با توجه به اندازه‌شان می‌توانند از طریق مکانیسم‌هایی در سلول‌ها درونی شوند و بر اساس پارامترهای فیزیکوشیمیایی تغییر کنند. از ویژگی‌های نانوذرات در زمینه زیست پزشکی می‌توان به زیست سازگاری، تشخیص هدف خاص و توانایی عملکرد سطح و استفاده از آنها به عنوان حامل استفاده کرد (۷). عملکرد نانوذرات نقره در مقابله با بیوفیلم چندین مزیت مانند نسبت سطح به حجم بالا نانوذرات، خواص فیزیکی قابل تنظیم نانوذرات مانند شکل و اندازه، زیست‌سازگاری و ویژگی‌های باکتریواستاتیک یا باکتری‌کشی که در غلظت‌های بسیار پایین نشان داده شده است، هستند. این اثر ضد میکروبی مستقیما از نانوذرات نقره و همچنین از یون‌های نقره که از انحلال آنها تشکیل می‌شوند، می‌آید. هم نانوذرات نقره و هم یون‌های نقره می‌توانند با اجزای متعدد سلول‌های پلانکتون باکتری و اجزای بیوفیلم تعامل داشته باشند و از طریق این فعل و انفعالات با متابولیسم باکتری‌ها تداخل ایجاد می‌کنند و عملکرد بیرونی سلول را مختل می‌کنند. اثر ضد میکروبی کلی نانوذرات نقره از تخریب دیواره سلولی، بی‌ثباتی پروتئین ساختاری، غیر فعال شدن پروتئین غشایی، غیر فعال شدن آنزیم، مهار زنجیره انتقال الکترون، آسیب به اسیدهای نوکلئیک و استرس اکسیداتیو ناشی از تولید گونه‌های اکسیژن فعال ناشی می‌شود (۶). با توجه به آنچه گفته شد هدف از این مطالعه بررسی مقایسه‌ای اثر ضد بیوفیلمی آنتی‌بیوتیک جنتامیسین و نانوذرات کلوئیدی نقره با بررسی غلظت MIC آنها است که با توجه به گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیوفیلم شکل گرفته در آنها، حائز اهمیت است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌ها: در این مطالعه تحقیقی، ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در پاییز ۱۴۰۱ از مراکز بهداشتی شهر کرمان جمع‌آوری شدند. سپس بر روی محیط کشت بلاد آگار خالص‌سازی و تست‌های شناسایی در خصوص آنها انجام شد که می‌توان به رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های کاتالاز و اکسیداز، کشت در محیط مانیتول سالت آگار و Dnase آگار اشاره کرد (۸). باکتری‌های شناسایی شده به روش گلیسرول استوک در محیط تریپتیک‌سوی‌براث (مرک-آلمان) و گلیسرول در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد برای انجام مراحل بعدی ذخیره شدند (۹).

آزمون آنتی‌بیوگرام: آزمون تعیین حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار از دیسک مطابق با اصول کمیته بین‌المللی بالینی و آزمایشگاهی (CLCI:2019) (۱۰) انجام شد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی شامل جنتامیسین (۱۰ µg)، اگزاسیلین (۱ µg)، پنی‌سیلین (۱۰ µg)، تتراسیکلین (۳۰ µg)، سیپروفلوکساسین (۵ µg)، (شرکت پادتن‌طب، ایران) بود. جهت انجام آزمون، ابتدا باکتری در محیط نوترینت براث تلقیح و لوله‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. سپس با اضافه کردن سرم فیزیولوژی استریل، غلظت باکتری‌ها معادل نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$) تنظیم و کشت ایزوله‌ها انجام شد (۹). دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با فاصله ۲۰ میلی‌متر از یکدیگر بر روی محیط قرار داده شدند. پلیت‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ ساعت انکوبه و نتایج بررسی شد. قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها با خط‌کش بر اساس میلی‌متر اندازه‌گیری و ایزوله‌ها بر اساس معیارهای مربوط به موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) در سه گروه حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش شدند (۱۱).

تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد ایزوله‌ها: دو ایزوله حساس و دو ایزوله مقاوم به آنتی‌بیوتیک جنتامیسین به تصادف انتخاب و حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد ایزوله‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک جنتامیسین (شرکت سیگما، آمریکا) و نانوذرات نقره تجاری (آرمینانو، ایران، با اندازه ۱۰-۲۵ نانومتر) بررسی شد. بدین صورت که غلظت‌های مختلف از نانوذرات نقره از ۳۴۰ تا ۲/۶۵ پی‌پی‌ام و آنتی‌بیوتیک جنتامیسین (از ۱۰۲۴ تا ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) با استفاده از رقت‌سازی در خانه‌های میکروتیترپلیت تهیه شد. سپس، به هر غلظت ۱۰ میکرولیتر از کدورت ۰/۵ مک‌فارلند ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* اضافه شد. میکروتیترتپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد تعیین شد (۱۲).

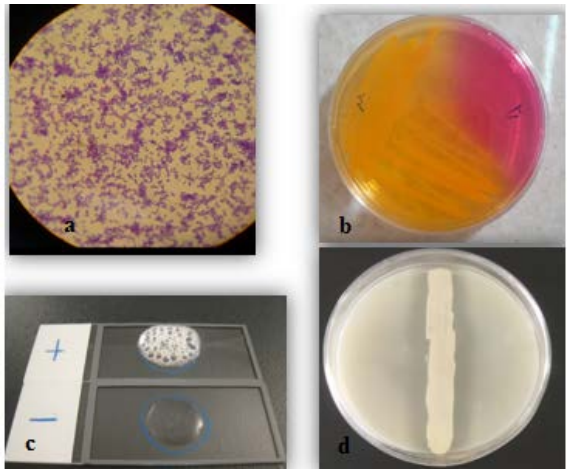
بررسی شکل‌گیری بیوفیلم: توانایی تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های انتخابی با استفاده از دستگاه الایزار یدر و خوانش جذب نوری بیوفیلم تشکیل شده بررسی شد. ابتدا از کشت تازه ایزوله‌ها، کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه و ۲۵۰ میکرولیتر از آن در داخل چاهک‌های میکروتیتر پلیت در شرایط استریل ریخته شد. از محیط کشت بدون باکتری به عنوان کنترل منفی استفاده شد (ODc). جهت تشکیل بیوفیلم، میکروتیترپلیت به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس، سوسپانسیون باکتری‌ها از چاهک‌ها خارج شد و هر چاهک سه مرتبه توسط ۳۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل شسته شدند. برای تثبیت باکتری‌های متصل به دیواره و کف چاهک، ۲۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ به چاهک‌ها به مدت ۱۵ دقیقه اضافه شد. سپس محتویات چاهک‌ها تخلیه و پلیت‌ها در دمای آزمایشگاه خشک شدند. چاهک‌ها توسط کریستال ویوله ۲٪ به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. سنجش کمّی تولید بیوفیلم بوسیله اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ درصد به هر چاهک صورت گرفت و به مدت ۱۵ دقیقه یا بیشتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و جذب نوری (OD) هر چاهک در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الایزار ریدر خوانده شد (۱۳).

بررسی اثرضد بیوفیلمی آنتی‌بیوتیک جنتامیسین و نانوذرات نقره بر شکل‌گیری بیوفیلم: ابتدا از غلظت‌های MIC، ۱/۲ غلظت MIC، ۱/۴ غلظت MIC و ۲ برابر غلظت MIC ایجاد شده برای ایزوله‌های انتخابی در مقابل آنتی‌بیوتیک جنتامیسین و نانوذرات نقره جهت بررسی اثر ضدبیوفیلمی استفاده شد (۱۳).

و) آنالیز آماری: اثر ضدبیوفیلمی غلظت‌های MIC ۲، MIC، MIC ۱/۲ و MIC ۱/۴ از آنتی‌بیوتیک جنتامیسین و نانوذرات نقره برای هر ایزوله، در سطح خطای ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS با یکدیگر مقایسه شدند.

یافته‌ها

ایزوله‌های گرم مثبت، دارای آرایش استاف، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، Dnase مثبت و همچنین توانمند در تغییر رنگ معرف فنل رد محیط مانیتول سالت آگار غربالگری و انتخاب شدند (شکل ۱).

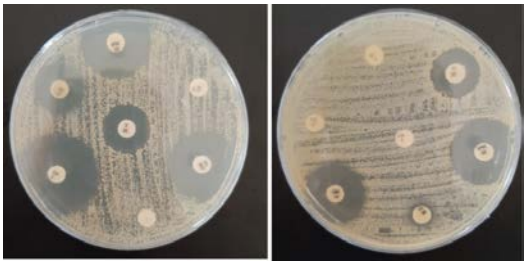


شکل ۱. (a) رنگ‌آمیزی گرم (b) رشد در محیط مانیتول سالت آگار (c) آزمون کاتالاز (d) رشد در محیط Dnase آگار

بر اساس نتایج و محاسبه درصد مقاومت و حساسیت باکتری‌ها (جدول ۱) بیشترین مقاومت ایزوله‌ها به ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های اگزاسیلین و پنی‌سیلین ۱۰۰ درصد، تتراسیکلین ۶۳/۳۳ درصد، سیپروفلوکساسین ۶/۶۶ درصد و جنتامیسین ۳/۳۳ درصد بوده است. ۹۳/۳۳ درصد ایزوله‌ها به سیپروفلوکساسین نیمه حساس بودند. در شکل ۲ تصویری از نتایج آنتی‌بیوگرام مشخص شده است.

جدول ۱: درصد فراوانی ایزوله‌های مقاوم، حساس و نیمه حساس استافیلوکوکوس اورئوس به هر آنتی‌بیوتیک

آنتی‌بیوتیک‌ها	(درصد) تعداد حساس	(درصد) تعداد نیمه حساس	(درصد) تعداد مقاوم
جنتامیسین	۲۹(۹۶/۶۶)	۰(۰)	۱(۳/۳۳)
اگزاسیلین	۰(۰)	۰(۰)	۳۰(۱۰۰)
پنی‌سیلین	۰(۰)	۰(۰)	۳۰(۱۰۰)
تتراسیکلین	۱(۳/۳۳)	۱۰(۳۳/۳۳)	۱۹(۶۳/۳۳)
سیپروفلوکساسین	۰(۰)	۲۸(۹۳/۳۳)	۲(۶/۶۶)



شکل ۲. تصویری از نتایج آنتی‌بیوگرام ایزوله‌ها

بررسی نتایج MIC نشان داد غلظت MIC ایزوله‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک جنتامیسین از ۶۴ تا ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و نانوذرات نقره از ۱۰/۶۲ تا ۵/۳۱ پی‌پی‌ام بود.

بررسی شکل‌گیری بیوفیلم در خصوص ۴ ایزوله انتخابی *استافیلوکوکوس اورئوس* با کدهای ۱، ۲، ۳ و ۴ بررسی شد که کدهای ۱ و ۲ مقاوم به جنتامیسین و کدهای ۳ و ۴ حساس به آنتی‌بیوتیک جنتامیسین بودند. بر اساس کلاس‌بندی ایزوله‌ها و با توجه به نتایج خوانش جذب بیوفیلم هر ایزوله (OD) مشخص شد ایزوله با کد ۳، بیوفیلم قوی و ایزوله‌ها با کد ۱، ۲ و ۴ بیوفیلم متوسط تشکیل دادند.

کلاس‌بندی ایزوله‌ها بر اساس OD بیوفیلم باکتری به صورت زیر انجام شد:

$OD \leq OD_C$ عدم شکل‌گیری بیوفیلم

$OD_C < OD \leq 2OD_C$ شکل‌گیری بیوفیلم ضعیف

$OD_C < OD \leq 4OD_C$ 2 شکل‌گیری بیوفیلم متوسط

$OD_C < OD$ 4 شکل‌گیری بیوفیلم قوی (۱۴،۱۵).

جدول ۲. نتایج خوانش جذب بیوفیلم ایزوله‌ها توسط الایزاریدر و کلاس‌بندی هر ایزوله

کد ایزوله	OD	ODc	کلاس‌بندی
۱	۰/۳۲۴	۰/۱۱	بیوفیلم متوسط
۲	۰/۳۶۲	۰/۱۱	بیوفیلم متوسط
۳	۰/۴۹۶	۰/۱۱	بیوفیلم قوی
۴	۰/۳۸۲	۰/۱۱	بیوفیلم متوسط

OD: جذب نوری بیوفیلم باکتری

ODc: جذب نوری چاهک شاهد

در بررسی اثر ضد بیوفیلمی آنتی‌بیوتیک جنتامیسین و نانوذرات نقره مشخص شدکه در غلظت‌های MIC و MIC ۲ از آنتی‌بیوتیک جنتامیسین، ایزوله‌های باکتریایی، چه مقاوم و چه حساس، بیوفیلم تشکیل ندادند، و در در غلظت‌های MIC ۱/۲، MIC و MIC ۲ از نانوذرات نقره بیوفیلم شکل نگرفته است.

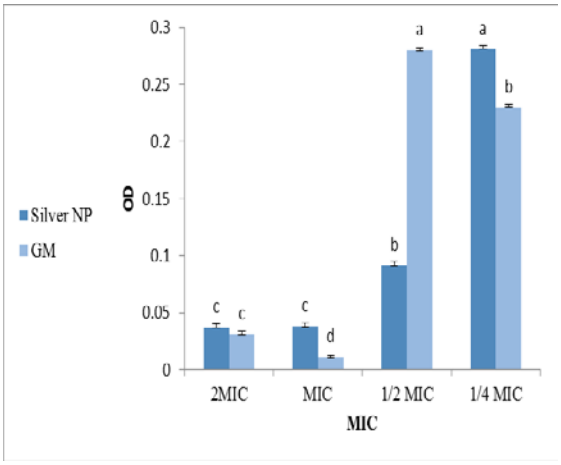
جدول ۳. بررسی اثر ضد بیوفیلمی آنتی‌بیوتیک جنتامیسین

کد ایزوله	۱/۴ MIC	۱/۲ MIC	MIC	۲ MIC
۱	بیوفیلم متوسط	بیوفیلم متوسط	عدم شکل‌گیری بیوفیلم	عدم شکل‌گیری بیوفیلم
۲	بیوفیلم ضعیف	بیوفیلم ضعیف	عدم شکل‌گیری بیوفیلم	عدم شکل‌گیری بیوفیلم
۳	بیوفیلم قوی	بیوفیلم متوسط	عدم شکل‌گیری بیوفیلم	عدم شکل‌گیری بیوفیلم
۴	بیوفیلم متوسط	بیوفیلم ضعیف	عدم شکل‌گیری بیوفیلم	عدم شکل‌گیری بیوفیلم

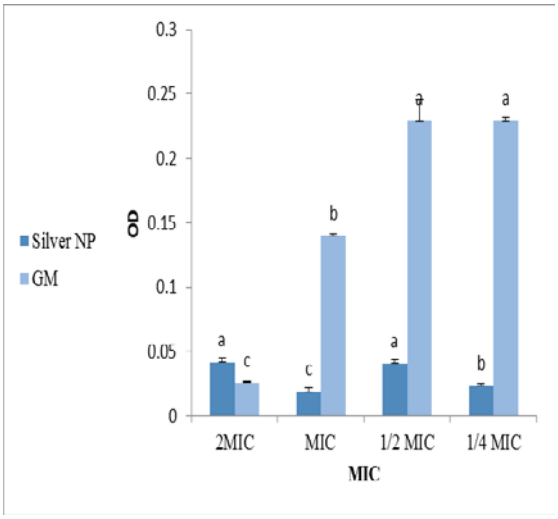
جدول ۴. بررسی اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره

کد ایزوله	۱/۴ MIC	۱/۲ MIC	MIC	۲ MIC
۱	بیوفیلم متوسط	عدم شکل‌گیری بیوفیلم	عدم شکل‌گیری بیوفیلم	عدم شکل‌گیری بیوفیلم
۲	بیوفیلم متوسط	عدم شکل‌گیری بیوفیلم	عدم شکل‌گیری بیوفیلم	عدم شکل‌گیری بیوفیلم
۳	بیوفیلم ضعیف	عدم شکل‌گیری بیوفیلم	عدم شکل‌گیری بیوفیلم	عدم شکل‌گیری بیوفیلم
۴	بیوفیلم متوسط	عدم شکل‌گیری بیوفیلم	عدم شکل‌گیری بیوفیلم	عدم شکل‌گیری بیوفیلم

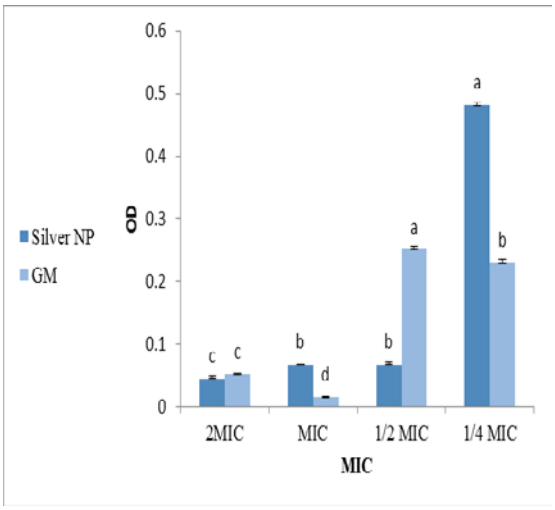
بر اساس نتایج، اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره و جنتامیسین در ایزوله ۱ در غلظت‌های ۱/۴ MIC، ۱/۲ MIC و MIC با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند اما در غلظت ۲ MIC اختلاف معنی‌دار نداشتند و اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره در ۱/۲ MIC بهتر از جنتامیسین بود (نمودار ۱). در ارتباط با ایزوله ۲ اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره و جنتامیسین در غلظت‌های ۱/۲ MIC، MIC و ۲MIC از یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره در ۱/۴ MIC، ۱/۲ MIC و MIC بهتر از جنتامیسین بود (نمودار ۲). بر اساس نتایج اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره و جنتامیسین در ایزوله ۳، غلظت‌های MIC، ۱/۲MIC، ۱/۴ MIC، با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند، اما در غلظت ۲MIC، اختلاف معنی‌دار نداشتند و اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره در ۱/۴ MIC، بهتر از جنتامیسین بود (نمودار ۳). در نهایت در ارتباط با ایزوله ۴، در غلظت‌های MIC ۲، MIC، ۱/۲MIC با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند، اما در غلظت ۱/۴ MIC اختلاف معنی‌دار نداشتند و اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره در ۱/۲ MIC، بهتر از جنتامیسین بود (نمودار ۴).



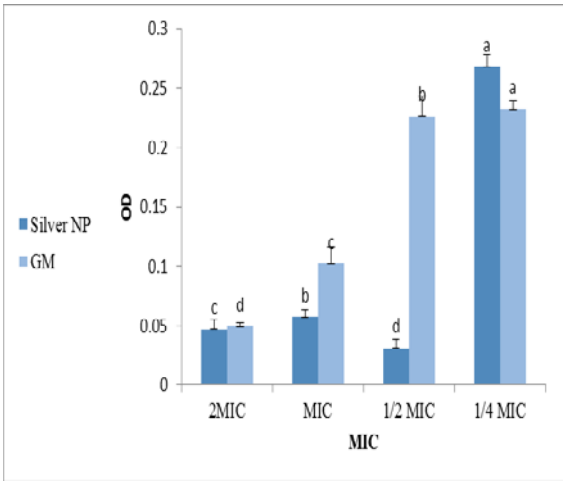
نمودار ۱. مقایسه اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره و آنتی‌بیوتیک جنتامیسین (ایزوله ۱). میله خطا نشان دهنده انحراف معیار است.



نمودار ۲. مقایسه اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره و آنتی‌بیوتیک جنتامیسین (ایزوله ۲). میله خطا نشان دهنده انحراف معیار است.



نمودار ۳. مقایسه اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره و آنتی‌بیوتیک جنتامیسین (ایزوله ۳). میله خطا نشان دهنده انحراف معیار است.



نمودار ۴. مقایسه اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره و آنتی‌بیوتیک جنتامیسین (ایزوله ۴) میله خطا نشان دهنده انحراف معیار است.

بحث و نتیجه‌گیری

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از پاتوژن‌های مهم در تشکیل بیوفیلم است و عامل عوارض گوناگونی از بیماری‌های جزئی تا عفونت‌های تهدید کننده حیات است. این باکتری به واسطه دارا بودن توانایی تشکیل بیوفیلم بر روی کاتترها، ایمپلنت‌های پزشکی، استخوان و دریچه مصنوعی قلب مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. برای درمان عفونت‌های ناشی از بیوفیلم از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود که این امر می‌تواند موجب گسترش مقاومت‌های دارویی شود. همچنین در عفونت‌های ناشی از تشکیل بیوفیلم بر روی دستگاه‌های پزشکی، درمان اغلب نیازمند خروج و جایگزینی دستگاه از بدن با جراحی است که همراه با عوارض و خطرات گوناگون است (۱۶). بنابراین امروزه با افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و در نتیجه بروز سویه‌های مقاوم، خلاء ناشی از کاربرد داروهای ضد میکروبی جدید که دارای اثرات جانبی کمتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها باشند به خوبی احساس می‌شود. همچنین بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است بر روی باکتری موثر باشند اما متاسفانه در حالتی‌که باکتری بیوفیلم تشکیل داده است بی‌تاثیر است. بنابراین یافتن داروهای ضد میکروبی جدید ضروری است (۱۷). نانوذرات از طریق واکنش الکترواستاتیکی به غشای باکتری‌ها متصل می‌گردند و با ایجاد اختلال در غشاء سبب تخریب غشاء باکتری‌ها به طور کامل می‌شوند. از مکانیسم‌های ضد میکروبی نانوذرات می‌توان به واکنش آمین و گروه‌های کربوکسیل با پپتیدوگلیکان دیواره باکتری‌ها اشاره کرد که این واکنش سبب آسیب دیدن دیواره سلولی آنها می‌شود. نانوذات معمولا دارای خواص و عملکرد بهتری از نمونه همان عنصر را از خود بروز می‌دهند، به دلیل اینکه نانوذرات دارای سطح ویژه بالاتری نسبت به ذرات درشت‌تر هستند (۱۸). تاکنون پژوهش‌هایی مبتنی بر واکنش‌های احتمالی بین نانوذرات نقره بر بیوفیلم ناشی از میکروارگانیسم‌های مختلف صورت گرفته است. برای شناسایی بیوفیلم روش‌های متفاوتی وجود دارد. یکی از این روش‌ها، روش کمی میکروتیترپلیت است که کاربرد وسیعی دارد و در مطالعات استفاده می‌شود. در پژوهش حاضر، اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره و آنتی‌بیوتیک جنتامیسین بر روی توانایی تشکیل بیوفیلم توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت‌های مختلف MIC با استفاده از میکروتیترپلیت و خوانش جذب توسط دستگاه الایزاریدر مورد بررسی قرار گرفت. طبق این پژوهش نانوذرات نقره قادر به ممانعت در شکل‌گیری بیوفیلم در غلظت‌های ۱/۲ MIC، MIC و ۱/۴ MIC معادل غلظت‌های ۱۰/۶۲، ۵/۳۱، ۲/۶۵ (پی‌پی‌ام) بودند. در پژوهش مرتضوی و همکاران (۱۳۹۴)، نانوذرات کلوئیدی در غلظت ppm ۰/۵ اثر ضد بیوفیلمی داشت (۱۹). در پژوهش چائودهاری (Chaudhari) و همکاران (۲۰۱۲) مشخص نمودند نانوذرات نقره بیوسنتز شده توانایی جلوگیری از شکل‌گیری بیوفیلم توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* را با میانگین قطر ۳۹ نانومتر و غلظت mM ۱ دارند (۲۰). شاهرخ و امتیازی (۲۰۱۳) نشان دادند محلول کلوئیدی نانوذره نقره در غلظت نهایی ppm ۲ می‌تواند تشکیل بیوفیلم در این باکتری را کاهش دهد (۲۱). کیم (Kim) و همکاران (۲۰۰۷) اثر ضد میکروبی

نانوذرات نقره علیه مخمر، *اشرشیاکولی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را بررسی کردند. رشد مخمر و *اشرشیاکولی* در غلظت‌های پایینی از نانوذرات نقره متوقف شد، درحالی‌که اثر مهاری رشد بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* خفیف بود (۲۲). اسپینوسا (Espinosa) (۲۰۰۹) نشان داد که هر چه سایز نانوذرات نقره کوچکتر باشد، اثر ضد میکروبی آنها نیز افزایش می‌یابد (۲۳). اختلاف در مقادیر MIC می‌تواند مربوط به قطر نانوذره، غلظت و نوع آن باشد. هر نوع از مواد نانو با توجه به ویژگی‌هایی مانند اندازه، شکل، نوع ترکیبات سورفکتانت، پایدار کننده و روش تهیه منحصر به فرد هستند و این ویژگی‌های نانوذرات بر خاصیت ضد میکروبی آنها اثر دارد. در منابع مختلف اثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره به ناپایدار کردن پتانسیل غشایی (که نتیجه آن کاهش سطح آدنوزین تری‌فسفات درون سلولی است)، اتصال به گروه‌های عاملی پروتئین‌ها (از بین رفتن خواص اصلی پروتئین‌ها و آنزیم‌ها)، نفوذ به درون سلول‌ها، غیر فعال کردن آنزیم‌ها و تولید هیدروژن پراکساید و در نهایت مرگ باکتری نسبت داده شده است. نانوذرات با چسبیدن به سلول باکتری، تشکیل بیوفیلم را عقب می‌اندازند که این عمل باعث می‌شود گروهی از باکتری‌ها نتوانند تثبیت شوند و تکثیر یابند (۱۹). بر اساس نتایج این پژوهش آنتی‌بیوتیک جنتامیسین قادر به ممانعت در تشکیل بیوفیلم در غلظت‌های MIC ۲، MIC ایزوله‌ها بود. با توجه به نتایج آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد، اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره در مقایسه با آنتی‌بیوتیک جنتامیسین بهتر بوده است و در غلظت MIC، MIC ۱/۲ و MIC ۱/۴ نتایج با یکدیگر در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار داشتند. بهترین اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره در غلظت MIC ۱/۲ بوده که با آنتی‌بیوتیک جنتامیسین در در همین غلظت اختلاف معنی‌دار داشته و بهتر عمل کرده است. پژوهشگران دیگری نیز در مورد ویژگی ضد بیوفیلمی آنتی‌بیوتیک جنتامیسین گزارش‌هایی داده‌اند. به طور مثال حمزئی و همکاران (۱۳۹۸) را بر روی باکتری *اشرشیاکولی* و *سودوموناس آئروژینوزا* بررسی کردند (۲۴). کرمی و همکاران (۱۴۰۰) نشان دادند جنتامیسین باعث کاهش ۹۵ درصد بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای ژن بیوفیلم *icaA* شد (۲۵).

در این پژوهش مشخص شد اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره در مقایسه با آنتی‌بیوتیک جنتامیسین بهتر بوده است بهترین اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره در غلظت MIC ۱/۲ بوده که با آنتی‌بیوتیک جنتامیسین در در همین غلظت اختلاف معنی‌دار داشته و بهتر عمل کرده است. بنابراین می‌توان پیشنهاد داد که از نانوذرات نقره به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها مانند آنتی‌بیوتیک جنتامیسین جهت جلوگیری از شکل‌گیری بیوفیلم در سطوح زیستی و غیر زیستی به ویژه در مراکز بهداشتی مانند بیمارستان‌ها استفاده کرد که این البته نیازمند مطالعات بیشتر است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان و همچنین آزمایشگاه تحقیقاتی شرکت یارا زیست بان کرمان، سرکار خانم پریا پارسیا جهت یاری رساندن به انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌کنند.

تعارض و منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

حمایت مالی

این پژوهش هیچ‌گونه حمایت مالی از نهادهای دولتی یا خصوصی نداشته است.

مشارکت نویسندگان

طراحی مطالعه و ایده اولیه: نادیا کاظمی‌پور، جمع‌آوری داده‌ها: زهرا عاطفی، آنالیز آماری: زهرا عاطفی،

نگارش دستنویس اولیه مقاله: زهرا عـاطفی، تائیـد نسـخه نهایی مقاله: نادیا کاظمی‌پور.

ملاحظات اخلاقی

پروتکـل ایـن پـژوهش در کمیتـه اخـلاق در پـژوهش دانشـگاه آزاد اسـلامی واحـد کرمـان بـا کـد اخـلاق IR.IAU.KERMAN.REC.1401.051 بـه تصـویب رسید. همچنین تمامی نکات اخلاقی شامل انتشار دوگانـه، عدم تحریف داده‌ها و عدم داده‌سازی در این مقالـه رعایـت شده است.

References

1. Nandhini P, Kumar P, Mickymaray S, Alothaim A, Somasundaram J, Rajan M. Recent Developments in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Treatment: A Review. Antibiotics. 2022; 11: 606.
2. Markowska K, Grudniak A, WolskaK. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. Biochimica polonica. 2013; 60(4): 523-530.
3. Seifoori Z, KazemiPour N. The study of antibiotic resistance and biofilm formation of isolated bacteria from upper respiratory tract in adult patients in Shahid Bahonar Hospital of Kerman. Pars Journal of Medical Sciences. 2020; 17(4): 17-25. (In Persian)
4. Amiri F, Kazemipour N. The Effect of Niosomal Nanosystem Containing Gentamicin on the Staphylococcus Aureus: A Laboratory Study. Rums. 2023; 22(3): 223-236. (In Persian)
5. Shin H, Yang S, Lim Y. Antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus with different degrees of biofilm formation. Journal of Analytical Science and Technology. 2021; 12(41): 1-7.
6. Singh P, Pandit S, Jers C, Joshi A. Silver nanoparticles produced from Cedecea sp. Exhibit antibiofilm activity and remarkable stability. Scientific reports. 2021; 11: 12619.
7. Menichetti A, Mavridi-Printezi A, Mordini D, Montalti M. Effect of Size, Shape and Surface Functionalization on the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. J. Funct. Biomater. 2023; 14: 244.
8. Kousalya K, Thirumurugu S, Arumainayagam D.C, Manavalan R, Vasantha J, Uma C. Antimicrobial resistance of bacterial agents of the upper respiratory tract in south Indian population. J Adv Pharm Technol Res. 2010; 1(2): 207–15
9. Pooyan S, Kazemipoue N, Rokhbakhsh-Zamin F. Biofilm formation and antimicrobial resistance of uropathogenic Escherichia coli and Klebsiella pneumonia strains isolated from pregnant women in Kerman, Iran. Pars J med Sci. 2019; 17(1): 15-24. (In Persian)
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. 2018.
11. Talaat, H., El Beskawy, M., Atwa, S., Eissa, M., Mahmmod, Y., Elkady, M., El-Diasty, M. Prevalence and Antibiogram of Staphylococcus aureus in Clinical and Subclinical Mastitis in Holstein Dairy Cows in Egypt. *Zagazig Veterinary Journal*. 2023; 51(1): 59-75.
12. Batool A, Bore M, Wu J, Li C, Zeng H. Augmented antibacterial activity of cefazolin with silver nanoparticles against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. J of Drug Delivery Sci and Tech. 2023; 85:104550.
13. Coriolano D, Souza J, Bueno E. Antibacterial and antibiofilm potential of silver nanoparticles against antibiotic-

sensitive and multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa strains. BJM. 2021; 52: 267-278.
14. Biswase S, Biswase I. Role of HtrA surface protein expression and biofilm formation by streptococcus mutans. Molecular pathogenesis. 2005; 73(10): 6923-6933.
15. Kubota H, Senda Sh, Nomura N, Tokuda H. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stree. Journal of bioscience and bioengineering. 2008; 106(4): 381-386.
16. Saidi N, Owlia P, Marashi M, Saderi H. The effect of probiotic yeast Saccharomyces cerevisiae on Staphylococcus aureus biofilm formation. Daneshvar medicine. 2018; 25(132): 55-62. [In Persian]
17. Mohamadian M, Ghafourian S. Anti-biofilm Properties of peganum harmala on staphylococcus aureus. Medilan. 2021; 4 (2). [In Persian]
18. Kadoughani Sani S, Farzin H, Jamshidian-Mojaver M, Amiri M. The Inhibitory Effect of Nanocomplex of Ganoderma and Silver Fungus Extract on Biofilms of Bacteria that Cause Nosocomial Infections.2021; 3(2): 137-144. (In Persian)
19. Mortazavi H, Nakhaei Moghaddam M, Nejad Shahrokh Abadi K. Study of the Effect of Silver Nanoparticles on Biofilms Formation by Staphylococcus epidermidis. JRUMS. 2015; 14 (2) :125-136. (In Persian)
20. Chaudhari P, MasurkarSh, Shidore V, Kamble S. Effect of Biosynthesized Silver Nanoparticles on Staphylococcus aureus Biofilm Quenching and Prevention of Biofilm Formation. Nano-micro letter. 2012; 4(1): 34-39.
21. Shahrokh, S., Emtiazi, G. A Comparative Study of the Effects of Colloidal Nanosilver and Industrial Biocide E-265 on Bacterial Respiration and Biofilm Formation Using Microtiterplate Method. Journal of Water and Wastewater; Ab va Fazilab .2013; 24(1): 26-33. (In Persian)
22. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ. Antimicrobial effects of silver nanoparticles, Nanomedicine. 2007; 3(1): 95-101.
23. Espinosa LF, Martinez GA, Martinez RE, Loyola JP, Patino N, Reyes JF. Antibacterial effect of silver nanoparticles against Streptococcus mutans. Materials Letters. 2009; 63(29): 2603-6.
24. Hamzeie M, Nomanpour B, Akhavansepahy A. The effect of bromhexine, gentamicin and imipenem on biofilm of standard bacterial Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa by ELISA method. Medical sciences. 2019; 29 (3) :216-221. (In Persian)
25. Karimi F, Habibollali H, Motlagh S. Comparison of the effect of garlic extract and gentamicin on icaA biofilm gene expression in Staphylococcus aureus. JDB. 2021; 13(4): 19-34. (In Persian)

Comparative Investigation of the Antibiofilm Effect of Colloidal Solution of Silver Nanoparticles and Gentamicin on the Biofilm Formed by Staphylococcus aureus Isolates

Atefi Z[1], Kazemipour N[2*]

1. MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

2.Associate Professor, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran, nadia_kazemi@yahoo.com

Received: *2023/7/30* Accepted: *2024/4/13*

Abstract

Background: *Staphylococcus aureus* is an opportunistic pathogen that plays a role in hospital infections. Due to the ability of this bacteria to produce biofilm, its antibiotic resistance has increased. Silver nanoparticles (AgNPs), due to their small size, can penetrate bacterial cells and destroy the bacterial biofilm. The present study aimed to investigate the anti-biofilm effect of AgNPs and gentamicin on clinical *Staphylococcus aureus*.

Materials and Methods: *Staphylococcus aureus* isolates were collected from health centers in Kerman, Iran, and identified by biochemical tests. The antibiotic resistance of the isolates was evaluated against antibiotics, and then, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the isolates was assessed by gentamicin and AgNPs. Bacterial isolates were exposed to 2 MIC, 1 MIC, ½ MIC, and ¼ MIC of gentamicin and AgNPs separately, and the results were compared.

Results: The 100% resistance of isolates to oxacillin and penicillin antibiotics was observed, and the resistance percentages 63.33%, 6.66%, and 3.33% to tetracycline, ciprofloxacin and gentamicin, respectively, were confirmed. The MIC of the isolates was from 64 µg/ml to 32 µg/ml against gentamicin, and it was from 10.62 ppm to 5.31 ppm against AgNPs. Comparing the anti-biofilm effect of AgNPs and gentamicin at 1 MIC, ½ MIC, and ¼ MIC, there was a significant difference at the 5% probability level, and the anti-biofilm effect of AgNPs was better than gentamicin.

Conclusion: According to the obtained results, it is suggested that AgNPs be used to control and destroy the biofilms formed by *Staphylococcus aureus* with further research.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Silver nanoparticles (AgNPs), Biofilm, Antibiotic resistance, Gentamicin.

Citation: Atefi Z, Kazemipour N. Comparative Investigation of the Antibiofilm Effect of Colloidal Solution of Silver Nanoparticles and Gentamicin on the Biofilm Formed by Staphylococcus aureus Isolates. Yafte. 2024; 26(1):13-24.