

The effect of silver nanoparticles synthesized with ginger on reducing *vanA* gene expression in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strains

Ehsan Al-Sabrawi¹, Farahnaz Molavi²

¹ MSc Student in Cellular and Molecular Sciences, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Department of Biology, Mashhad, Iran

² Assistant Professor, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Department of Biology, Mashhad, Iran

Abstract

Background: One of the factors causing the resistance of *Enterococcus faecalis* bacteria to the vancomycin antibiotic is the *vanA* gene, and the purpose of this research is to investigate the effect of silver nanoparticles on the expression of the *vanC* resistance gene.

Materials and methods: In this study, 98 isolates were examined after confirming the presence of the *vanA* gene and the antibiogram test of the treatment, the bacteria with multidrug resistance with the lowest ability to silver nanoparticles were performed and with the Real-time PCR technique, the data were analyzed. It was related to the change of gene expression. *vanA* was transformed in two analysis groups.

Results: Antibiotic resistance of the strains was 50% to vancomycin, 32% to ciprofloxacin, 15% to chloramphenicol, 5% to teicoplanin, 43% to erythromycin, 79% to amikacin, 80% to tetracycline, 80% to cephalixin, 85% to penicillin, and 1% to linezolid. Real-time analysis on the resistant strains in which the presence of *vanA* gene was confirmed by PCR and treated with silver nanoparticles showed that the effect of nanoparticles on the expression of *vanA* gene is significant.

Conclusion: Existing 87% of the multidrug resistance in 64 confirmed strains indicates that the issue of multidrug resistance is a serious warning in the use of antibiotics to treat infections caused by *Enterococcus faecalis* and the effectiveness of silver nanoparticles on *vanA* gene expression indicates that It can be used as an alternative to antibiotics in infections caused by *Enterococcus faecalis*.

Keywords: *Streptococcus*, *Vancomycin*, *Metal nanoparticles*, *Multidrug-resistant*, *Ginger*.

Cited as: Al-Sabrawi E, Molavi F. The effect of silver nanoparticles synthesized with ginger on reducing *vanA* gene expression in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strains. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2024; 34(1): 37-45.

Correspondence to: Farahnaz Molavi

Tel: +98 9155116504

E-mail: Farahmolavi@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-2491-8348

Received: 30 May 2023; **Accepted:** 29 Aug 2023

تاثیر نانوذرات نقره سنتز شده با زنجبیل بر کاهش بیان ژن *vanA* در سویه‌های انتروکوکوس فکالیس مقاوم به آنتی بیوتیک و نکومایسین

احسان الصعبرای^۱، فرحناز مولوی^۲

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

چکیده

سابقه و هدف: یکی از عوامل ایجاد مقاومت باکتری انتروکوکوس فکالیس به آنتی بیوتیک و نکومایسین ژن *vanA* است. هدف از این تحقیق، بررسی تاثیر نانوذرات نقره بر میزان بیان ژن مقاومت به نکومایسین *vanA* بود.

روش بررسی: در این مطالعه ۹۸ جدایه بررسی شدند بعد از تایید حضور ژن *vanA* و آزمون آنتی بیوگرام تیماردهی باکتری های دارای مقاومت چند دارویی با حداقل غلظت مهارکننده نانوذرات نقره انجام شد و با تکنیک *Real-time PCR* داده های مربوط به تغییر بیان ژن *vanA* در دو گروه تحلیل گردید.

یافته‌ها: مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک و نکومایسین ۵۰٪، سیپروفلوکساسین ۳۲٪، کلرامفنیکل ۱۵٪، تیکوپلانتین ۵٪، اریترومایسین ۴۳٪، آمیکاسین ۷۹٪، تتراسایکلین ۸۰٪، سفالکسین ۸۰٪، پنی سیلین ۸۵٪، و لینوزولید ۱٪ بود. ارزیابی مولکولی نشان دهنده حضور ژن *vanA* در تمام سویه های دارای مقاومت چنددارویی بود. بررسی ریل تایم بر روی سویه های مقاومی که وجود ژن *vanA* در آنها توسط *PCR* به تایید رسیده و تحت تیمار نانوذرات نقره قرار گرفته بود نشان داد که تاثیر نانوذرات نقره بر روی بیان ژن *vanA* معنی دار و کاهشنده است.

نتیجه گیری: مشاهده ۸۷ درصد مقاومت چند دارویی از ۶۴ سویه تایید شده نشان دهنده این است که مسئله مقاومت چند دارویی یک هشدار جدی در استفاده از آنتی بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های ناشی از انتروکوکوس فکالیس است.
واژگان کلیدی: استرپتوکوک، نکومایسین، نانوذرات فلزی، مقاوم به چند دارو، زنجبیل.

مقدمه

انواع آنتی بیوتیک‌هایی که در انتروکوکوس فکالیس مقاومت ایجاد کرده‌اند، مقاومت به نکومایسین بسیار شایع و فراوان است (۳). این مقاومت به واسطه مجموعه ژن‌های *van* حاصل می‌شود که در بین مجموعه ژن‌های گروه *vanA*، *van*، *vanA* بالاترین فراوانی و اهمیت را در این مقاومت دارد (۴). با توجه به اینکه هر ساله هزینه‌گزافی بابت کنترل عفونت‌های ناشی از این باکتری پرداخت می‌شود و همچنین با توجه به اینکه انتروکوکوس فکالیس به صورت ذاتی و اکتسابی به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند می‌توان از مواد ضدباکتریایی دیگری همانند نانوذرات استفاده کرد و آنها را به

انتروکوک فکالیس یک باکتری گرم مثبت است که در اکثر کشورها مسبب عفونت‌های گسترده در بیمارستان هاست (۱). وجود مقاومت در این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک‌ها یکی از معضلات کنترل عفونت‌های ناشی از آن است (۲). در میان

آدرس نویسنده مسئول: مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، فرحناز

مولوی (email: Farahmolavi@gmail.com)

ORCID ID: 0000-0002-2491-8348

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۳/۹

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۶/۷

از محلول نیترات نقره ۱ میلی مولار مخلوط گردید. بعد از تغییر رنگ، محلول در میکروتیوپ های ۲ میلی لیتری ریخته شده و با دور ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی خارج شده و ۲ میلی لیتر آب دیونیزه یا آب مقطر به رسوب اضافه شد و سانتریفیوژ تکرار شد این مرحله ۳ بار دیگر تکرار گردید و در انتها رسوب نهایی در پلیت های جداگانه ریخته شد و در محل تاریک گذاشته شد تا خشک گردد و پودر نانوذره آماده گردد (۷). برای بررسی خصوصیت فیزیکی نانوذره به دست آمده از روش های عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری (دانشگاه فردوسی مشهد)، FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) Bruker Tensor ۲۷-دانشگاه آزاد واحد مشهد) ودستگاه طیف سنج پراش پرتو ایکس (XRD) (X-Ray Diffraction) (Explorer GNR- دانشگاه فردوسی مشهد) استفاده شد.

تست حساسیت آنتی بیوتیکی

بعد از شناسایی نمونه ها میزان حساسیت نمونه ها به آنتی بیوتیک های رایج و پرمصرف آزمایش شد تا نمونه های مقاوم برای ادامه پژوهش جدا شوند آنتی بیوگرام سوبه های به دست آمده با استفاده از روش انتشار از دیسک (کربی بائر) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، از باکتری های رشد کرده سوسپانسیون معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید (۸) و بر روی محیط مولر هینتون آگار به صورت کشت سفره ای کشت داده شد. پلیت ها به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند تا باکتری ها با شرایط جدید سازگاری یابند. پس از آن دیسک های آنتی بیوتیک ونکومایسین (۳۰ μg)، سیپروفلوکساسین (۳۰ μg)، کلرامفنیکل (۳۰ μg)، تیکوپلانین (۳۰ μg)، اریترومایسین (۱۵ μg)، آمیکاسین (۳۰ μg)، تتراسیکلین (۳۰ μg)، پنی سیلین (۱۰ IU)، لینزولید (۳۰ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg) روی محیط قرار گرفت به طوری که فاصله دیسک ها از لبه پلیت ۱/۵ سانتیمتر و نسبت به هم ۲/۵ سانتی متر بود. سپس پلیت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از این مدت اطراف دیسک ها از لحاظ هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفتند قطر ناحیه اطراف دیسک توسط خط کش مخصوص (Antibiotic Zone Scale ruler) اندازه گیری و با مراجعه به جداول کمیته ملی معیارهای آزمایشگاهی بالینی (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI) حساسیت یا مقاومت باکتری به آنتی بیوتیک های رایج تعیین گردید (۸). در نهایت پس از ۲۴ ساعت انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد حداقل غلظت

تنهایی یا به همراه آنتی بیوتیکها به کار گرفت. در بین انواع نانوذرات، نانوذرات نقره پتانسیل ضد میکروبی قویتری دارند که مدت هاست به عنوان روش جایگزین آنتی بیوتیکها برای مقابله با عفونت باکتریایی مورد بررسی است (۵)؛ لذا در این پژوهش اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره بر روی بیان ژن *vana* به عنوان یکی از عوامل موثر بر مقاومت *انتروکوکوس فکالیس* مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روشها

در این مطالعه توصیفی- مقطعی ۹۸ سوبه از ۹ آزمایشگاه تشخیص طبی شهر مشهد در فاصله زمانی ۵ ماهه (از آبان ۱۳۹۸ تا فروردین ۱۳۹۹) جمع آوری و به آزمایشگاه تحقیقات سلولی- مولکولی گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد واحد مشهد منتقل شدند.

تایید هویت سوبه های جمع آوری شده

برای تشخیص جنس *انتروکوکوس* نخست تمام سوبه ها روی آگار خون دار کشت داده شدند و سپس از رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، هیدورلیز نمک های صفراوی ۴۰ درصد و رشد در محیط BHI حاوی سدیم کلراید ۶/۵ درصد استفاده شد. بعد از تایید جنس سوبه ها، به منظور تشخیص گونه فکالیس از ازمون تخمیر قند آرابینوز، مانیتول، سوربیتول و لاکتوز و ... در لوله های دارای محیط فنل رد برات (با Ph ۷/۴-۷/۵) با نسبت یک درصد از قندهای فوق و انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد (۶). برای تایید شناسایی گونه ها بعد از استخراج ژنوم باکتری با روش جوشاندن از پرایمرهای مختص گونه جهت PCR استفاده شد (۶) و محصول pcr روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی Stain S الکتروفورز برده شد و توسط دستگاه Geldocument مشاهده گردید.

ساخت نانوذره نقره

نانوذرات نقره به روش سبز و با استفاده از عصاره زنجبیل ساخته شد. برای این منظور پودر زنجبیل در آب مقطر حل گردید (به ازای هر گرم پودر زنجبیل ۱۰ سی سی آب مقطر استریل استفاده شد) محلول به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد و سپس به ویال ۵۰ میلی لیتری منتقل گردید. این ویال ۱۲ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ به یک پلیت منتقل شده و در مجاورت شعله فیلتر شد. ۱۰ میلی لیتر از این عصاره فیلتر شده به ویال ۵۰ میلی لیتری منتقل شد و با ۱۰ میکرو لیتر

سلسیوس برای ۱۰ دقیقه انجام شد (۱۲). میزان تغییر بیان ژن با استفاده از نرم افزار SPSS16 و آزمون One way ANOVA تجزیه و تحلیل شد در تمام موارد سطح معنی داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ژن *vanA* در اتروکوکوس فکالیس

نام ژن	توالی پرایمر (۵ پیم به ۳ پیم)	دمای Anneling
<i>vanA</i>	F: GGCTCATCCTTCGGGTGTGAA R: GTCCACCTCGCCAACAACACTA	۵۹
16S RNA	F: CCAACCTTTTCTTACTTGC R: CATCAACTTCACCTTACGC	۵۹

سنجش بیان ژن با روش Real-Time PCR:

واکنش Real-Time PCR با حجم ۲۰ میکرولیتر و با استفاده از کیت (Genet bio CAT. NO: Q9210) کره جنوبی به صورت زیر انجام شد: ۱۰ میکرولیتر از Prime Qmaster mix (2x) with syber green، ۵ میکرولیتر از Depc water، یک میکرولیتر از هر دو پرایمر، یک میکرولیتر از Rox dye با دو میکرولیتر از cDNA استفاده شد. تکثیر قطعه ای مورد نظر در دستگاه Applied Biosystems StepOnePlus با برنامه واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۱۵ دقیقه، تکثیر شامل واسرشت در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه در ۳۰ چرخه انجام شد. برای تعیین میزان بیان نسبی ژن *vanA*، آنالیز داده ها و رسم نمودارها از LightCycler Relative Quantification Software استفاده گردید. داده های مربوط به تعبیر بیان ژن *vanA* با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ با فرض کارایی ۱۰۰ درصد و با استفاده از آزمون آماری T مستقل در دو گروه آنالیز شد (۱۴).

آشکار سازی محصولات PCR با تکنیک الکتروفورز ژل آگارز

برای بررسی نتیجه استخراج DNA و PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. به این منظور، محصول روی ژل آگارز ۱ درصد و در بافر TBE به مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز شد (۱۴). نتایج توسط دستگاه Geldocument با نور uv مشاهده شد.

یافته‌ها

در مجموع ۶۴ نمونه باکتری با استفاده از تست‌های تشخیصی و تاییدی میکروبیولوژی/بیوشیمیایی/مولکولی به

بازدارندگی رشد (Minimum Inhibitory of Concentration: MIC) باکتری تعیین شد. در تمام این مطالعه از سویه ATCC 51559 کیه عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده شده است.

جهت ارزیابی حساسیت باکتری در برابر نانوذرات نقره از دو روش انتشار چاهک در آگار و روش ماکرودایلوشن (روش سری رقت در لوله) استفاده شد (۹). برای تهیه سری رقت از نانوذرات از روش سازی سریال از نانوذره نقره، سری رقت های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ و ۱۵/۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد.

استخراج RNA

استخراج RNA طبق روش کار کیت مخصوص (۵۲۹۲) شرکت پارس طوس زیست فناوری و پس از تیمار دهی سوسپانسیون باکتریایی واجد ژن *vanA* با نانوذره نقره (رقت بعد از حداقل غلظت بازدارندگی رشد) انجام شد. برای اطمینان از صحت استخراج نمونه، ارزیابی کمی از طریق روش جذب نوری سپس نمونه های استخراج شده مورد بررسی اسپکتروفتومتری قرار گرفت. سپس نسبت OD260 به OD280 را بررسی کرده و در صورت جذب نوری بین ۲۳۰/۲۶۰ تا ۲۶۰/۲۸۰، نانومتر با دستگاه نانودراپ انجام شد (۱۰).

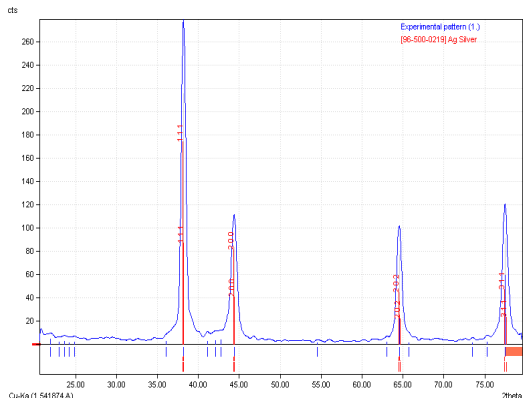
سنتز Complementary DNA

پس از تایید مقدار و غلظت RNA ساخته شده در مرحله قبل، ساخت cDNA از RNA استخراج شده با استفاده از کیت مخصوص (A101161) شرکت پارس طوس زیست فناوری انجام شد.

PCR (polymerase chain reaction) و الکتروفورز

پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش با نرم افزار الیگو طراحی شدند و برای سنتز به شرکت سیناکلون ایران سفارش داده شدند (جدول ۱). واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵/۵ میکرولیتر 5X PCR master mix (ایران، سیناکلون) دارای ۵ U/μl Taq DNA polymerase، ۳ MgCl₂، ۰/۴ mM از dNTPs، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۱۰/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانته ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) و با برنامه دمایی، دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه برای ۳۴ سیکل در شرایط واسرشته شدن (Denaturation) ۹۴ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر (Annealing) ۵۸ درجه برای ۳۰ ثانیه، طویل شدن (Extension) ۷۲ درجه سانتی-گراد برای ۳۰ ثانیه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه

همچنین نتایج پراش اشعه ایکس (XRD) با طول موج ۱.۵۵ Å نشان داد که اکثر نانوذرات شکل مکعبی داشتند و ۴ پیک جذبی در آنها تشخیص داده شد (شکل ۳).



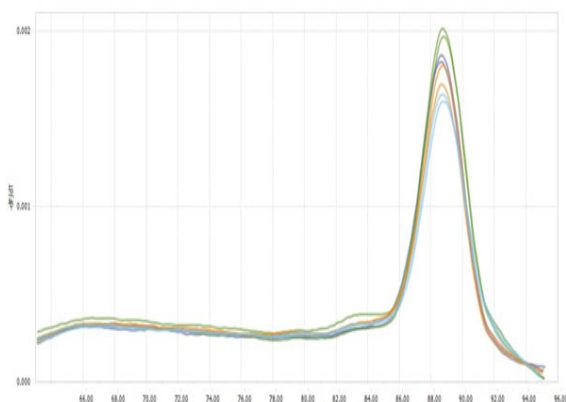
شکل ۳. الگوی پراش اشعه ایکس بر نانوذره نقره ساخته شده در پژوهش. محور افقی نشان دهنده زاویه بین پرتو تابش و بازتابش و محور عمودی نشان دهنده شدت پرتوی ایکس بازتابیده است.

نتایج آزمون MIC

میزان MIC برای *انتروکوکوس فکالیس* $62/5 \text{ mg}\mu\text{l}^{-1}$ و MBC آن برای این باکتری $31/25 \text{ mg}\mu\text{l}^{-1}$ نانو ذره بود.

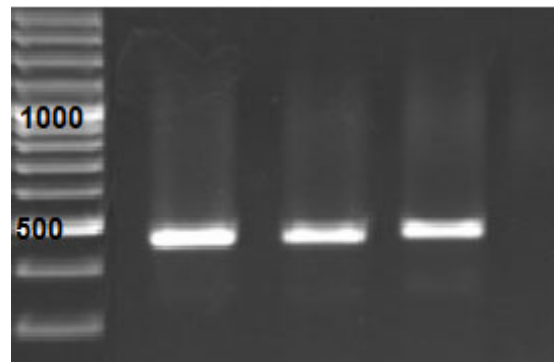
بیان ژن *vanA* بعد از تیمار با مهارکننده نانوذرات نقره

برای مقایسه اثر نانوذرات نقره بر بیان ژن *vanA* ، بعد از استخراج RNA و سنتز DNA، بیان ژن به صورت کمی در دو گروه سلولی تیمار شده و تیمار نشده با استفاده از آنالیز منحنی ذوب و منحنی تکثیر بررسی شد (شکل‌های ۲، ۳). میزان بیان ژن *vanA* در نمونه های تیمار شده نسبت به نمونه تیمار نشده تغییر نشان داد و بر اساس نتایج به دست آمده از سنجش بیان ژن Pvalue برای ژن $0/05$ کمتر بود که بیانگر اختلاف آماری معنی دار در بیان ژن در بین دو گروه بود.



شکل ۴. آنالیز منحنی ذوب (Melting curve) برای اطمینان از اختصاصی بودن قطعه های تکثیر شده ژن *vanA* که منحنی ژن مورد سنجش در تمام نمونه ها با هم منطبق و بصورت یک قله است.

عنوان *انتروکوکوس فکالیس* شناسایی شدند. مقاومت سویه-ها نسبت به آنتی بیوتیک ونکومایسین ۵۰٪، سیپروفلوکساسین ۳۲٪، کلرامفنیکل ۱۵٪، تیکوپلانیل ۵٪، اریترومایسین ۴۳٪، آمیکاسین ۷۹٪، تتراسایکلین ۸۰٪، سفالکسین ۸۰٪، پنی سیلین ۸۵٪، و لینوزولید ۱٪ بود که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک پنی سیلین (۸۵ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به لینوزولید (۱ درصد) بود. از بین نمونه های بررسی شده ۸۷ درصد مقاومت به بیش از ۱ آنتی بیوتیک داشتند و در نتیجه MDR بودند.



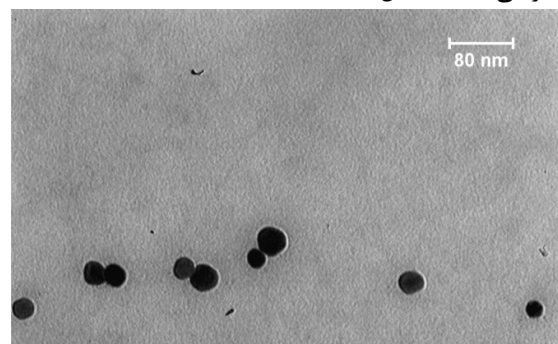
شکل ۱. نتایج الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *vanA* از چپ به راست شامل DNA Ladder، کنترل مثبت، ۲ سویه مثبت حاوی ژن *vanA* و نمونه کنترل منفی است. طول قطعه مورد نظر ۴۵۰ جفت باز است.

نتایج تکثیر ژن حاصل از روش PCR

در این مطالعه تمام سویه های دارای مقاومت چند دارویی حامل ژن *vanA* بودند. تکثیر ژن *vanA* در نمونه های مورد مطالعه وجود باند ۴۵۰ bp را در ژل الکتروفورز نشان داد.

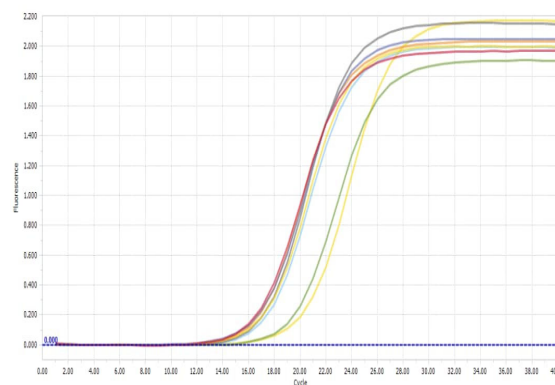
بررسی ریخت شناسی نانوذره نقره سنتز شده

بررسی نانوذره نقره با میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد که نانو ذرات این بررسی اکثرا شکل کروی با اندازه ۲۲/۳۹ تا ۹۳/۳۵ نانومتر و تعداد بسیار کمی بصورت مثلثی و مربعی است (شکل ۲).

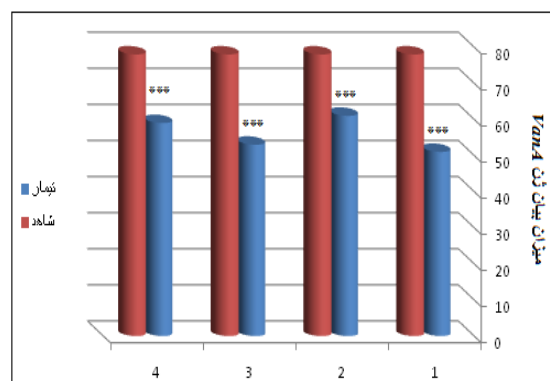


شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از نانوذره نقره ساخته شده

این باکتری را تایید می‌کند. مطالعات گسترده‌ای در خصوص شناخت مقاومت و مکانیسم‌های وقوع مقاومت در *انتروکوکوس فکالیس* انجام شده است و نتایج نشان داده است که بیشترین مقاومت این باکتری به انواع گلیکولپتیدها است، ولی علاوه بر گلیکوپتیدها نسبت به سایر آنتی بیوتیک‌های نیز مقاومت وسیعی دیده می‌شود، از جمله این موارد میتوان به بتالاکتام‌ها و آمینوگلیکوزیدهایی مانند جنتامیسین و استرپتومایسین اشاره کرد (۱۲). آمینوگلیکوزیدها به دلیل خصوصیت هم افزایی که در اثر ترکیب آنها با عوامل مهار کننده دیواره سلولی مانند بتالاکتامها و گلیکوپتیدها دارند؛ در عفونت‌های خطرناک گونه‌های استفاده می‌گردد (۱۳). در این مطالعه بیشترین درصد مقاومت سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* به پنی سیلین بود که قبلا نیز گزارش شده بود (۱۴). تحقیقات گذشته در راستای نتیجه به دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهند که میزان شیوع مقاومت *انتروکوکوسوس فکالیس* و *انتروکوکوسوس فیسوم* نسبت به سایر سویه‌های *انتروکوکوس* بیشتر است (۱۵). این بررسی نشان می‌دهد که ۵۰ درصد از سویه‌ها به ونکومایسین مقاوم بودند که این نتیجه با مطالعات گذشته مطابقت دارد (۱۵). دلیل وجود مقاومت در *انتروکوکوس فکالیس* نسبت آنتی بیوتیک‌هایی نظیر ونکومایسین، مجهز بودن این باکتری به انواع متنوع فاکتورهای ویروالانس است (۱۶) و این مقاومت در *انتروکوکوس فکالیس* در مقایسه با سایر باکتری‌ها باعث گسترش شیوع آن شده است، به طوری که اولین عامل عفونت در میان کوکسی‌های گرم مثبت عفونت‌زا در مجاری ادراری و سومین عامل عفونت باکتریایی در مجاری زنان در ایران پس از *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا نمونیه* هستند (۱۷). مشابه با بررسی ما، مطالعه‌ای در جنوب هند انجام شد و در این تحقیق میزان مقاومت به آنتی بیوتیک‌های سفالکسین، جنتامیسین، کوتریماسازول، ونکومایسین و لینوزولید به ترتیب ۱۰۰٪، ۹۰٪، ۸۵٪، ۵٪ و صفر درصد گزارش شد (۱۸). میزان مقاومت کم به آنتی بیوتیک لینوزولید در بررسی ما نیز به دست آمد و فقط یک درصد سویه‌ها به این آنتی بیوتیک مقاوم بودند. شاید یکی از دلایل پایین بودن میزان مقاومت نسبت به لینوزولید، استفاده گسترده نکردن از این آنتی بیوتیک در موارد درمانی باشد. در این بررسی تمام نمونه‌ها که به ونکومایسین مقاوم بودند، ژن *vanA* وجود داشت. وجود ژن *vanA* در نمونه‌های مقاوم به ونکومایسین در مطالعات گذشته نیز گزارش شده است (۱۹).



شکل ۵. نتایج منحنی تکثیر محصول در Real time PCR بر حسب سیکل



شکل ۶. مقایسه میزان بیان ژن *vanA* در ۴ سویه تحت تیمار با نانوذرات نقره در مقایسه با نمونه کنترل (سوسپانسیون فاقد نانوذرات). *** نشان دهنده سطح معنی داری است ($P < 0.05$)

بحث

انتروکوکوس فکالیس یک عامل پاتوژن فرصت طلب است که به علت شیوع گسترده و افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی آن، از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی در سراسر دنیا محسوب می‌شود که می‌تواند منجر به بیماری‌های خطرناکی همانند عفونت‌های ادراری یا اندوکاردیت شود (۹،۱۰). افزایش روزافزون مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری مشکلی بزرگ در درمان بیماران است و مقاومت *انتروکوکوس فکالیس* به ونکومایسین یک نگرانی جدی در درمان عفونت‌های مرتبط با این باکتری است. بر اساس گزارشات سازمان نظارت بر عفونت‌های بیمارستانی ایالات متحده که در یک دوره ۵ ساله از سال‌های ۱۹۹۸ لغایت ۲۰۰۳ انجام شد، افزایش مقاومت ۱۲ درصدی در گونه‌های مختلف *انتروکوکوس* ها به خصوص گونه *انتروکوکوسوس فکالیس* نشان داده شده است (۱۱). مطالعه حاضر نیز نشان داد که ۸۷ درصد سویه‌ها دارای مقاومت چند دارویی هستند و این نتیجه گسترش مقاومت

تحقیق حاضر با استفاده از آزمون MIC و MBC بهترین غلظت مهارکننده نانوذرات نقره استفاده شد. همچنین اسدی و همکارانش در سال ۱۳۹۲ نشان دادند که متغیرهایی مانند نوع باکتری، مدت زمان تماس و غلظت نانوذرات نقره عوامل مؤثر بر بروز خاصیت ضد میکروبی نانوذرات نقره هستند (۳۳). مطالعه حاضر نشان می‌دهد که نانوذره نقره می‌تواند گزینه‌ای برای جلوگیری افزایش شیوع مقاومت در بین سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* باشد؛ لذا می‌تواند گزینه مناسبی برای درمان عفونت‌های ناشی *انتروکوکوس فکالیس* در بیمارستان و تغییر رویکرد درمانی باشد. این پیشنهاد در مطالعه آزادی و همکارانش در سال ۱۳۹۵ نیز ارائه شده است و آنها ارتباط معنی‌داری بین MIC نانوذره نقره در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با منشا جداسازی نمونه و مقاومت به متی‌سیلین و جنتامایسین را نشان دادند و ابراز کردند که با توجه به پایین بودن MIC نانوذره نقره بر ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین، امکان استفاده از آن در کنترل MRSA در عفونت بیمارستانی می‌تواند مورد توجه بیشتری قرار گیرد (۳۴). البدیری و همکارانش نیز در سال ۱۴۰۰ بر خاصیت ضد میکروبی نانوذرات نقره تاکید کردند و آن را گزینه مناسبی برای کنترل عفونت‌های بیمارستانی دانستند (۳۵). از نتایج این مطالعه نتیجه‌گیری می‌شود که ژن *vanA* می‌تواند به عنوان ابزار تشخیصی در شناسایی مولکولی *انتروکوکوس فکالیس* مقاوم به ونکومایسین استفاده شود و با توجه به پتانسل بالای نانوذره نقره بر مهار رشد این باکتری، اثر مهاری آن نباید نادیده گرفته شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان نامه شماره ۱۶۱۵۹۵ آقای احسان الصعبرای برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی سلولی و مولکولی از دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد بود. بدین وسیله از سرکار خانم بهاره سرگزی که در تمام مراحل اجرای پایان نامه مشاور طرح بودند و سرکار خانم فائزه غلامی بهار و آقای علی قرایی و تمام کارشناسان محترم آزمایشگاه گروه زیست‌شناسی به خاطر همکاری در تمام مراحل سپاسگزاری می‌شود.

نتیجه تحقیق حاضر نشان می‌دهد که نانوذرات نقره می‌توانند باعث کاهش بیان ژن *vanA* شده و بدین وسیله می‌توانند مقاومت باکتری *انتروکوکوس فکالیس* را در هم بشکنند و خاصیت ضدباکتریایی داشته باشند و این بر خلاف یافته‌های صادقیان در سال ۲۰۱۵ است که نشان داد نانو ذرات نقره با توجه به غلظت‌های مورد استفاده اگرچه بر *انتروکوکوس فکالیس* موثرند، ولی باعث حذف کامل باکتری نمی‌شوند (۲۰). اما مطالعه سلمانی و همکارانش در سال ۲۰۱۷ که بر روی فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات نقره علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی انجام شد، خاصیت ضدباکتریایی گسترده نانوذرات نقره را اثبات کرد (۲۱). سودمندی استفاده از نانوذرات در کنترل انواع عفونت‌های باکتریایی در تحقیقات دیگر نیز تایید شد (۲۲) و مقالات متعددی نانوذرات نقره را به عنوان یک عامل ضدباکتری قوی بر علیه باکتری‌های مقاوم شده معرفی کرده‌اند (۲۵-۲۳). اثر مهارکننده نانوذرات نقره روی *استافیلوکوکوس آئروژینوزا* و *انتروکوکوس فکالیس* توسط محققان ارائه شده (۲۶) است. در *اشرشیا کلی* مکانیسم ضدباکتریایی نانوذرات نقره مشخص شده است. آنها با عبور از غشای باکتری و چسبیدن به زیرواحدهای پروتئینی باکتری *اشرشیا کلی* خاصیت ضدباکتری خود را نمایش می‌دهند (۲۷). اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره روی گونه‌های مختلف جنس *استافیلوکوکوس* نیز به اثبات رسیده است (۲۸). برخی مطالعات چنین نشان می‌دهند که نانوذرات نقره بهترین گزینه جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌ها در انواع باکتری‌های دارای مقاومت چندارویی هستند (۲۹). در واقع یکی از راه‌های امیدوارکننده برای از بین بردن مقاومت‌های باکتریایی، استفاده از نانوذرات فلزی است (۳۰). نانوذرات با اندازه کوچک و سطح تماس بالایی که دارند می‌توانند به راحتی وارد سلول باکتری شوند و باعث تداخل در عملکرد پروتئین‌های حاوی سولفور و مولکول‌های دارای فسفر، نظیر DNA شوند (۳۱). نانوذراتی که در این تحقیق استفاده شده‌اند، اکثراً شکل کروی با اندازه ۲۲/۳۹ تا ۹۳/۳۵ نانومتر و تعداد بسیار کمی به صورت مثلثی و مربعی هستند و تحقیقاتی که انجام شده است نشان می‌دهد که اندازه نانوذره یکی از فاکتورهای بسیار مهم در خاصیت ضدباکتریایی آن است. همچنین غلظت استفاده شده نیز در این خاصیت نانوذرات مؤثر است (۳۲) که در

REFERENCES

1. Zhou X, Willems RJL, Friedrich AW, Rossen JWA, Bathoorn E. Enterococcus faecium: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. Antimicrob Resist Infect Control 2020; 9:130.

2. Chilambi GS, Hinks J, Matysik A, Zhu X, Choo PY, Liu X, et al. Enterococcus faecalis Adapts to Antimicrobial Conjugated Oligoelectrolytes by Lipid Rearrangement and Differential Expression of Membrane Stress Response Genes. *Front Microbiol* 2020; 11:155.
3. Vestergaard M, Skive B, Domranceva I, Ingmer H, Franzyk H. Peptide/ β -Peptoid Hybrids with Activity against Vancomycin-Resistant Enterococci: Influence of Hydrophobicity and Structural Features on Antibacterial and Hemolytic Properties. *Int J Mol Sci* 2021; 22:5617.
4. Markwart R, Willrich N, Eckmanns T, Werner G, Ayobami O. Low Proportion of Linezolid and Daptomycin Resistance Among Bloodborne Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium and Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Infections in Europe. *Front Microbiol* 2021; 12:664199.
5. Azad A, Rostamifar S, Modaresi F, Bazrafkan A, Rezaie Z. Assessment of the Antibacterial Effects of Bismuth Nanoparticles against Enterococcus faecalis. *Biomed Res Int* 2020; 2020:5465439.
6. Saeidi S, Mirnejad R, Masoumi Zavariani S, Rostasmzadeh S. Molecular Identification of Pathogenic Enterococci and Evaluation of Multi-drug Resistance in Enterococcus Species Isolated From Clinical samples of Some Hospitals in Tehran, Iran. *Modern Med Lab J* 2018; 1:60-7.
7. Rashid A, Molavi F, Mahmoudzadeh H. The effect of silver nanoparticles on mecA gene expression in methicillin-resistant samples of Staphylococcus aureus. *New Cell Mol Biotech* 2020; 11:67-82 [In Persian]
8. Willems RJ, Bonten MJ. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20:384-90.
9. Von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, Duyster J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet* 2002; 359:487-91.
10. Ramirez CB, Cantey JB. Antibiotic resistance in the neonatal intensive care unit. *Neo Reviews* 2019;20: e135-ee44.
11. van Hal SJ, Willems RJL, Gouliouris T, Ballard SA, Coque TM, Hammerum AM, et al. The global dissemination of hospital clones of Enterococcus faecium. *Genome Med* 2021;13:52.
12. National Nosocomial Infections Surveillance System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004; 32: 470-85.
13. Harada S, Shibue Y, Aoki K, Ishii Y, Tateda K. Prevalence of High-Level Aminoglycoside Resistance and Genes Encoding Aminoglycoside-Modifying Enzymes in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium Isolated in a University Hospital in Tokyo. *Jpn J Infect Dis* 2020;24;73:476-480.
14. Khodabandeh M, Mohammadi M, Abdolsalehi MR, Hasannejad-Bibalan M, Gholami M, Alvandimanesh A, Pournajaf A, Rajabnia R. High-level aminoglycoside resistance in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium; as a serious threat in hospitals. *Infectious Disorders-Drug Targets J* 2020; 20:223-8.
15. Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFG, Voss, European VRE study group. Prevalence of vancomycin-resistant Enterococci in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:816-22.
16. Jannati E, Amirmozaffari N, Saadatmand S, Arzanlou M. Faecal carriage of high-level aminoglycoside-resistant and ampicillin-resistant Enterococcus species in healthy Iranian children. *J Glob Antimicrob Resist* 2020;20:135-144.
17. Saifi M, Rahimi F, Nakhost Lotfi M, Pourshafie MR, Soltan Dallal MM. Prevalence and antibiotic resistance of Enterococci species isolated from two sewage treatment plants in Tehran. *Iran Bio J* 2018; 21: 250-260. [In Persian]
18. Shiadeh SMJ, Azimi L, Azimi T, Pourmohammad A, Goudarzi M, Chaboki BG, et al. Upregulation of efrAB efflux pump among Enterococcus faecalis ST480, ST847 in Iran. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2020;25;67:187-192.
19. Shafiyabi S, Mariraj J, Sumathi S, Krishna S. Emergence of vancomycin resistant Enterococci in a tertiary care hospital in South India. *Int J Pharm Biomed Res* 2013; 4: 111-113.
20. Sun L, Xu J, Wang W, He F. Emergence of vanA-Type Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium ST 78 Strain with a rep2-Type Plasmid Carrying a Tn1546-Like Element Isolated from a Urinary Tract Infection in China. *Infect Drug Resist* 2020; 13:949-955.
21. Sadeghian M, Habibipour R, Asghar Seif I. Effect of Silver Nano-Particle on Removing the Enterococcus faecalis Bacterium isolated from Industrial Resid. *mljgoums* 2015;9:133 – 138. [In Persian]

22. Salmani M, Survey of Silver Nanoparticles Antibacterial Activity against Gram-Positive and Gram-negative Bacteria in Vitro TB 2017; 16:74-84. [In Persian]
23. Parolia A, Kumar H, Ramamurthy S, Madheswaran T, Davamani F, Pichika MR, et al. Effect of Propolis Nanoparticles against Enterococcus faecalis Biofilm in the Root Canal. *Molecules J* 2021; 26:715.
24. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Bio and Med* 2007;3:95-101.
25. Gordon O, Vig Slenters T, Brunetto PS, Villaruz AE, Sturdevant DE, Otto M, et al. Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:4208-18.
26. Shahmoradi S, Shariati A, Zargar N, Yadegari Z, Asnaashari M, Amini SM, et al. Antimicrobial effects of selenium nanoparticles in combination with photodynamic therapy against Enterococcus faecalis biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2021;13; 35:102398.
27. Seyedeh S, Hendi N, Amiri B, Poormoradi M, Yousef A, Saeid-Afshar M. Antibacterial Effects of Erbium Chromium Laser along with/without Silver Nanoparticles in Root Canals Infected by Enterococcus faecalis. *Int J Dent* 2021;3:6659146.
28. Rashid A, Molavi F, Mahmoudzadeh H. The effect of silver nanoparticles on mecA gene expression in methicillin-resistant samples of Staphylococcus aureus. *New Cell Mol Biotech* 2020; 11:67-82
29. Namasivayam S.K.R., Ganesh S, Avimanyu, B. Evaluation of anti-bacterial activity of silver nanoparticles synthesized from Candida glabrata and Fusarium oxysporum. *Int J Med Res* 2011;1:131-136.
30. Tian J, Wong KK, Ho CM, Lok CN, Yu WY, Che CM, et al. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMed Chem* 2007;2:129-36.
31. Abd El-Aziz NK, Ammar AM, El-Naenaey EYM, El Damaty HM, Elazazy AA, Hefny AA, et al. Antimicrobial and antibiofilm potentials of cinnamon oil and silver nanoparticles against Streptococcus agalactiae isolated from bovine mastitis: new avenues for countering resistance. *BMC Vet Res* 2021;17:136.
32. Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine* 2012;8:37-45.
33. McNeilly O, Mann R, Hamidian M and Gunawan C Emerging Concern for Silver Nanoparticle Resistance in Acinetobacter baumannii and Other Bacteria. *Front Microbiol* 2021: 2: 652863.
34. Asadi M, Khosravi-Darani K, Mortazavi A, Hajseyed Javadi N, Azadnia E, Kiani Harchegani A, et al. Antimicrobial effect of silver nanoparticles produced by chemical reduction on Staphylococcus aureus and Escheirchia coli. *Iran J Nutr Sci Food Technol* 2014; 8:83-92.
35. Azadi Fahimeh, Jamali Ayler, Bai Basira, Bazuri Massoud, Shakeri Fatemeh, Ghaemi Ezatollah. Minimum inhibitory concentration of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and its relationship with methicillin resistance and source of bacterial isolation. *J Gorgan Univ Med Sci* 2016, 18: 86-91. [In Persian]
36. Albadiri V, Molavi F, Tehranipoor M. The effect of silver nanoparticles on blaTEM gene expression in beta-lactamase-resistant samples in *Escherichia coli*. *J Microbiol* 2021;39:87-100. [In Persian]