

ارزیابی تأثیر پپتید ضد میکروبی IDR-1018 و نانوذرات کیتوزان بر ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا حساس و مقاوم به ایمی پنم جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری از بخش ICU

- آیدا حاجی حسین تبریزی^۱، مهري حبيبي^{۲*}، فاطمه فروهي^۳، طاهر محمدیان^۴، محمدرضا اسدی کرم^۵
۱. دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
 ۲. استادیار، گروه بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
 ۳. استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
 ۴. استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
 ۵. دانشیار، گروه بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها موجب افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک های معمول در درمان عوامل عفونت دستگاه ادراری شده است. در این مطالعه ارزیابی اثر ضد باکتریایی نانوذرات کیتوزان و پپتید IDR-1018 علیه ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفت.

روش ها: در مطالعه حاضر ۲۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا مقاوم و ۲۰ ایزوله حساس به آنتی بیوتیک ایمی پنم از بیماران مبتلا به عفونت ادراری جداسازی گردید. توانایی تشکیل بیوفیلم و حضور سه ژن دخیل در تولید بیوفیلم شامل *pelF* و *pslD* در این ایزوله ها به ترتیب با روش های کریستال و بوله و PCR بررسی گردید. اثر ضد باکتریایی آنتی بیوتیک ایمی پنم، پپتید ضد میکروبی IDR-1018 و نانوذرات کیتوزان با تعیین حداقل غلظت مهاري (MIC) با روش میکرودیلوژن برآورد ارزیابی گردید.

نتایج: تولید بیوفیلم در این ایزوله ها به صورت ضعیف (۱۰٪)، متوسط (۳۵٪) و قوی (۵۵٪) بود. فراوانی حضور سه ژن مربوط به بیوفیلم *algD* و *pslD* و *pelF* به ترتیب ۹۰٪، ۸۰٪ و ۷۵٪ مشاهده شد. مقادیر MIC برای ایزوله ها به ترتیب ۱۶-۱۲۸ $\mu\text{g/ml}$ برای ایمی پنم، ۴۰ و ۸۰ $\mu\text{g/ml}$ برای پپتید IDR-1018، ۳۷۵ و ۷۵۰ برای نانوذرات کیتوزان بدست آمد.

نتیجه گیری: یافتن راهکارهای جایگزین مانند پپتیدهای ضد میکروبی و نانوذرات می تواند در درمان سویه های سودوموناس آئروژینوزا موثر باشد. نتایج مطالعه نشان داد که پپتید IDR-1018 و نانوذرات کیتوزان به تنهایی و یا در ترکیب با آنتی بیوتیک ایمی پنم می توانند به عنوان راهکار درمانی مطرح باشند.

کلید واژه ها:

عفونت دستگاه ادراری، سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آنتی بیوتیکی، نانوذرات کیتوزان، پپتید IDR-1018

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه محفوظ است.

مقدمه

بنابراین مطالعات برای یافتن عوامل ضد میکروبی جدید بسیار حایز اهمیت می باشد. از مهمترین راهکارهای مطرح شده جایگزین آنتی بیوتیک‌ها پپتیدهای ضد میکروبی و نانوذراتی باشند(۷).

کیتوزان یک بیوپلیمر کاتیونی است که از استیله‌زدایی کیتین بدست می‌آید و به دلیل زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری در مطالعات پزشکی بسیار مورد توجه می باشد. نانوذرات ساخته شده از کیتوزان سبب بهبود هدفمندسازی، رهایش آهسته دارو، افزایش جذب و پایداری دارو و کاهش اثرات مضر دارو می شود (۸).

پپتیدهای ضد میکروبی نیز به دلیل و سيع الطيف و سريع الاثر بودن و عدم ایجاد مقاومت دارویی بسیار مورد مطالعه می باشند. پپتید ضد بیوفیلیم IDR-1018 دارای ۱۲ آمینو اسید می باشد که مشتق از bacterenecin است که یک پپتید ضد میکروبی تولید شده توسط نوتروفیل Bovine می باشد. تاثیر این پپتید بر روی باکتری‌های مختلف از جمله سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلی، اسیتوباکتر بومانی، کلبسیلا پنومونیه، سالمونلا انتریکا و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مطالعه گردیده و نتایج بیانگر تاثیر این پپتید در مهار تشکیل و همچنین تخریب بیوفیلیم تشکیل شده می باشد (۹). ترکیب پپتید ضد بیوفیلیم IDR-1018 با آنتی بیوتیک‌های متداول علیه ۶ گونه باکتری ذکر شده در بالا نشان می دهد که این پپتید در ترکیب با آنتی بیوتیک‌ها دارای اثر سینرژیسیم می باشد (۱۰). استفاده از نانوذرات کیتوزان و پپتید ضد بیوفیلیم IDR-1018 راهکارهای بسیار مناسب درمانی بر علیه عفونت های ادراری می باشند. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی توانایی تولید بیوفیلیم وارزیابی حضور سه ژن مرتبط با بیوفیلیم psID, algD و pelF در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا حساس و مقاوم به ایمی پنم جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری انجام شد.

عفونت دستگاه ادراری یکی از رایج ترین عفونت ها در انسان می باشد که اغلب در مسیر صعودی دستگاه ادراری رخ می دهد (۱). به طور کلی مسیر حرکت پاتوژن ادراری بدین صورت است که باکتری موجود در مدفوع با تلقیح در منطقه پری یورترال از طریق مسیر پیدشایره به مثانه رفته و در اپیتلیوم سطحی مثانه تکثیر کرده و ایجاد عفونت مثانه یا سیستیت را می کند. حدود ۹۰٪ عفونت‌های ادراری، میکروب‌ها از راه مستقیم و با عبور از مجرای خروجی ادرار به مثانه می رسند. عفونت دستگاه ادراری توسط عوامل پاتوژن متعدد بروز می کند که سودوموناس آئروژینوزا در موارد عفونت‌های ادراری وابسته به بیمارستان بسیار مطرح است (۲). سودوموناس آئروژینوزا با عث عفونت‌های پیچیده دستگاه ادراری می شود که می تواند سبب درگیری مثانه و کلیه شود و این عفونت در برخی از زیر گروه‌ها مانند افراد مسن و زنان بیشتر می باشد. عفونت‌های دستگاه ادراری سودوموناس آئروژینوزا بسیار مقاوم به آنتی بیوتیک هستند و اغلب نیاز به درمان پرهزینه دارند (۳).

توانایی تشکیل بیوفیلیم همراه با مقاومت ذاتی و کسب سریع مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها بر معضلات درمان عفونت های وابسته به سودوموناس آئروژینوزا می افزاید (۴). ساختار بیوفیلیم با محاصره باکتری در ماتریکس پلیمری خارج سلولی سبب محافظت آنها در برابر محیط اطراف مانند سیستم ایمنی و آنتی بیوتیک‌ها می شود و با نقص درمان و عود عفونت همراه می باشد. سودوموناس آئروژینوزا دارای حداقل سه پلی ساکارید خارج سلولی تشکیل دهنده بیوفیلیم می باشد که شامل آلژینات، Psl و Pel است (۵).

درمان معمول عفونت های ادراری بر پایه استفاده از آنتی بیوتیک‌های مختلف است که شامل پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها، فلوروکینولون ها و کارباپنم ها می باشد. افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی و تشکیل ساختارهای بیوفیلیم پایدار سبب عدم تاثیر درمان‌های آنتی بیوتیکی روتین در درمان عفونت دستگاه ادراری ناشی از سودوموناس آئروژینوزا گردیده است (۶).

روش‌ها

تست‌ها برای هر ایزوله ۳ بار تکرار شد و بیوفیلم‌ها به ۳ دسته قوی، متوسط و ضعیف طبقه بندی شدند (۱۱).

حضور ژن‌های کد کننده‌ی اگزوپلی ساکاریدهای بیوفیلم (algD، pelF و psID) با روش Polymerase Chain Reaction (PCR) و با استفاده از پرایمرهای موجود در جدول شماره ۱ بررسی گردید. استخراج DNA به روش جوشاندن (Boiling) انجام شد. برای انجام واکنش PCR، ۱۲/۵ میکرولیتر از محلول نهایی (۲/۵ میکرو لیتر DNA، ۵ میکرو لیتر Taq 2× Master Mix (Ampliqon, Denmark)، ۰/۲۵ میکرو لیتر از پرایمرهای Forward و Reverse با غلظت ۱۰ pmol/μl و ۴/۵ میکرو لیتر آب مقطر) با یکدیگر مخلوط گردید. واکنش تکثیر این ژنها در دستگاه ترموسایکلر شامل دناتوراسیون اولیه (Initial denaturation) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، دناتوراسیون به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، سپس ۳۰ چرخه ۴۰ ثانیه ای در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد (برای ژن های algD، pelF) و ۵۶ درجه سانتیگراد برای ژن psID ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و مرحله افزایش طول نهایی (Elongation) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بود. سپس محصولات نهایی روی ژل آگاروز ۱٪ در ولتاژ ۱۲۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز گردید و در مرحله بعدی محصولات با نور UV آنالیز شدند.

پبتید ضد میکروبی IDR1018 حاوی ۱۲ اسید آمینه با خلوص بالای ۹۵ درصد توسط شرکت Biomatik کانادا سنتز گردید. پودر پس از حل شدن در آب برای استفاده بیشتر در ۸۰- نگهداری شد. پودر آنتی بیوتیک ایمپنم از شرکت سیگما خریداری شد و سپس محلول استوک از پودر خشک آن پس از حل شدن در بافر فسفات تهیه گردید و در دمای ۲۰- سانتی گراد نگهداری شد.

پودر کیتوزان و تری پلی فسفات از شرکت سیگما خریداری شدند. محلول ۵ میلی گرم کیتوزان در اسید استیک ۱٪ آماده شد. به دلیل حلالیت پایین کیتوزان این مخلوط ورتکس شده تا کاملاً کیتوزان در محلول حل شود و به مدت ۲۴ ساعت بر روی

در این مطالعه ۲۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا حساس و ۲۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمپنم جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری از بخش ICU بیمارستان های مختلف سطح شهر تهران جداسازی گردید و پس از انتقال به بخش بیولوژی مولکولی انستیتو پاستور تهران، توسط تست های بیوشیمیایی تایید گردید و برای استفاده بعدی در ۸۰- ذخیره گردید. نمونه گیری از بیماران طبق قوانین کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران با کد اخلاقی IR.PII.REC.1399.056 انجام گرفت. محیط کشت های (LB) Luria-Bertani، Mueller Hinton broth (MHB) و Tryptic Soy broth (TSB) برای این مطالعه استفاده گردید. سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC27853 به عنوان سویه مقاوم به ایمپنم به کار برده شد.

جهت ارزیابی توانایی تولید بیوفیلم، ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا در ۵ میلی لیتر محیط TSB تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس در محیط TSB تا کدورت ۰/۵ مک فارلند رقیق شدند. سپس میزان ۱۰۰ میکرو لیتر از رقت های تهیه شده به چاهک های میکروپلیت پلی استیرن ۹۶ خانه تلقیح گردید. سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 و محیط مایع استریل به عنوان کنترل مثبت و منفی مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت انکوبه سیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، مایع رویی (حاوی سلول های غیر چسبنده) خارج شد و چاهک‌ها با محلول نرمال سالین سه بار شستشو داده شدند. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرو لیتر متانول مطلق به هر چاهک برای تثبیت اضافه شد و بعد از ۲۰ دقیقه چاهک‌ها شستشو داده شدند. در مرحله بعد چاهک‌ها با ۲۰۰ میکرو لیتر کریستال ویوله (۱در صد وزنی در حجم) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند. لکه های موجود با آب شستشو داده شدند و رنگ در ۱۵۰ میکرو لیتر از اسید استیک ۳۳٪ حل شد. سپس جذب نوری هر یک از چاهک‌ها با استفاده از دستگاه الیزا ریدر که روی ۵۹۰ نانومتر تنظیم شده بود خوانده شد. همه

شدند و شدت پراکندگی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با ضریب شکست ۱/۳۳ اندازه گیری شد. ویژگی‌های شکلی نانوذرات فریزدرای شده کیتوزان با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) تعیین شد. بررسی فعالیت ضد میکروبی ایمپنم، پیتید IDR-1018 و نانوذرات کیتوزان با روش میکرودیولوشن برآش انجام شد. برای این منظور ابتدا ایزوله‌ها در محیط کشت LB در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با هوادهی در لوله‌های ۱۵ میلی لیتری برای ۲۴ ساعت رشد داده شدند. سپس جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر برای هر یک از ایزوله‌ها توسط اسپکتروفوتومتر تعیین شد. عوامل ضد میکروبی به صورت سریال دیلوشن به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شدند و سپس سوسپانسیون‌های باکتری در محیط مولر هینتون برآش رقیق شدند و در غلظت نهایی CFU/ml 5×10^6 به هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه افزوده شدند. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوبه شدند. مقدار MIC به عنوان کمترین غلظت یک عامل ضد میکروبی (ایمی پنم، پیتید ضد بیوفیلیم IDR-1018 و نانوذرات کیتوزان) که به طور کامل از رشد قابل مشاهده جلوگیری می‌کند تعیین شد.

جدول شماره ۱: پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های کدکننده اگزوپلی ساکاریدهای بیوفیلیم در ایزوله‌های سودوموناس

آنروژینوزا

Gene	primer sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Size of amplicon (bp)	مرجع
algD	F-CTACATCGAGACCGTCTGCC R-GCATCAACGAACCGAGCATC	۵۸	۵۹۳	(۱۲)
pelF	F-GAGGTCAGCTACATCCGTCG R-TCATGCAATCTCCGTGGCTT	۵۸	۷۸۹	(۱۲)
pslD	F-TGTACACCGTGCTCAACGAC R-CTTCCGGCCCCGATCTTCATC	۵۶	۳۶۹	(۱۲)

میکرومتری به دلیل عدم جداسازی کامل ذرات ایجاد شده است. همچنین بازده فرایند تولید نانوذرات در حدود ۹۵٪ بود. نانوذرات تولیدی با استفاده از محلول کیتوزان با غلظت ۱ mg/ml، ۲، محلول TPP با غلظت ۱ mg/ml و نسبت کیتوزان به TPP ۳ به ۱ بدست آمد و متوسط اندازه آنها برابر با ۲۳۲ نانومتر بود.

استیرر مغناطیسی در دمای اتاق قرار داده شد. برای حذف ناخالصی‌ها از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر استفاده شد. محلول استوک کیتوزان برای تهیه غلظت مورد نظر با آب دیونیزه استریل رقیق شد و pH برابر ۵ تنظیم گردید. نانوذرات کیتوزان با روش ionic gelation آماده شدند. به اید صورت که کیتوزان با سدیم تری پلی فسفات (TPP) با غلظت ۱ mg/ml به نسبت ۳ به ۱ مخلوط شد. محلول TPP به صورت dropwise به کیتوزان اضافه گردید و از همزن با سرعت ۷۵۰ rpm به مدت ۴۵ دقیقه برای تهیه نانوذرات استفاده شد. برای تهیه رسوب نانوذرات کیتوزان محلول با دور ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و نانوذرات حاصل در آب مقطر حل شد (۱۳). غلظت‌های متفاوت از نانوذرات کیتوزان بین ۳/۹ میکروگرم تا ۲ میلی گرم بر میلی لیتر برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفت.

میانگین توزیع اندازه ذره‌ای، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی در مورد نانوذرات به دست آمده با استفاده از روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) با کمک دستگاه نانوزتاسایزر در طول موج ۶۳۳ nm تعیین شد. نمونه‌ها در کوت پلی استرین قرار داده

نتایج

نتایج به دست آمده از بررسی اندازه نانوذرات به وسیله روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) در جدول شماره ۲ آورده شده است. همان طور که از نتایج مشخص است، درصد بالایی از ذرات ایجاد شده در محدوده نانومتر بودند. ذرات دارای ابعاد

مشاهده گردید که به صورت alg+/psID+ /pelF+، alg-/psID- /pelF- و algD+/psID+ /pelF- /pelF- بود.

نتایج MIC ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا حساس و مقاوم به ایمی پنم که از بیماران مبتلا به عفونت ادراری جداسازی شده بودند برای آنتی بیوتیک ایمی پنم، پپتید ضد بیوفیلیم IDR-1018 و نانوذرات کیتوزان در جدول شماره ۳ نشان داده شده است که رنج بین ۱۶-۱۲۸ $\mu\text{g/ml}$ برای ایمی پنم، ۴۰-۸۰ $\mu\text{g/ml}$ برای پپتید و ۳۷۵-۷۵۰ $\mu\text{g/ml}$ برای نانوذرات کیتوزان بدست آمد. برای سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC27853 حداقل غلظت مهاری (MIC) برای ایمی پنم ۴۰ $\mu\text{g/ml}$ ، پپتید ۴۰ $\mu\text{g/ml}$ و نانوذرات کیتوزان ۷۵۰ بدست آمد.

بررسی ارتباط بین شدت تشکیل بیوفیلیم با مقاومت به ایمی پنم و حضور ژن ها در جدول شماره ۴ آورده شده است. همانطور که مشاهده می شود ارتباط معناداری بین حضور دو ژن psID و pelF با شدت تشکیل بیوفیلیم وجود دارد و تنها ایزوله های تولید کننده بیوفیلیم قوی و متوسط حاوی این ژن ها بودند.

تصویربرداری نانوذرات کیتوزان با میکروسکوپ SEM نشان دهنده یک ساختار هموزن و تقریباً با شکل نیمه کروی بود (شکل شماره ۱).

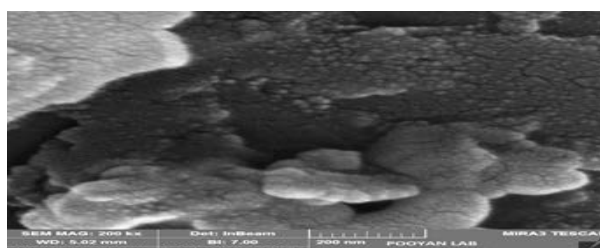
نتایج حاصل از بررسی تولید بیوفیلیم با روش کریستال ویوله در جدول شماره ۳ آورده شده است. تمام ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا قدرت تولید بیوفیلیم را داشتند که شدت آنها به سه صورت ضعیف، متوسط و قوی گزارش گردید. اکثر ایزوله ها دارای قدرت تولید بیوفیلیم قوی بودند (۵۵٪). تولید بیوفیلیم به صورت متوسط و ضعیف به ترتیب در ۳۵٪ و ۱۰٪ ایزوله ها مشاهده شد.

نتایج حاصل از PCR برای ژن algD و psID و pelF دخیل در تشکیل بیوفیلیم در جدول شماره ۳ آورده شده است. طبق نتایج PCR، فراوانی ژن های algD، psID و pelF در بین سویه های حساس و مقاوم سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۹۰٪، ۸۰٪ و ۷۵٪ مشاهده شد که بیانگر شیوع بالای ژن ها می باشد. بر اساس حضور ژن ها، ۴ الگوی ژنتیکی در بین تمام ایزوله ها

جدول شماره ۲: اندازه، شاخص پراکنندگی و پتانسیل زتای نانوذرات کیتوزان

CS	TPP	نسبت حجمی کیتوزان/TPP	اندازه	پتانسیل زتا	PDI
۲	۱	۳:۱	۸۹۰/۷	۵۱/۶	۰/۹۳۹

(nm)	Diam.	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 232	% Intensity	697.2
PdI: 0.312	Peak 1: 166.5	38.1
Intercept: 0.606	Peak 2: 574.5	36.1
Result quality Good	Peak 3: 4375	25.8



شکل شماره ۱: ویژگی های شکلی نانوذرات فریزدرای شده کیتوزان با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره SEM

جدول شماره ۳: نتایج حاصل از تشکیل بیوفیلم، تکثیر ژن و MIC ترکیبات در ایزوله های حساس و مقاوم به ایمنی پنم

شماره ایزوله	جنس بیمار	بیوفیلم	algD	pslD	pelF	ایمپینم MIC (µg/ml)	پپتید MIC (µg/ml)	کیتوزان MIC (µg/ml)	حساس یا مقاوم به ایمنی پنم
۱	مرد	متوسط	-	-	-	۶۴	۸۰	۷۵۰	مقاوم
۲	مرد	قوی	+	+	+	۲۲	۸۰	۷۵۰	مقاوم
۳	زن	ضعیف	-	-	-	حساس	۸۰	۷۵۰	حساس
۴	مرد	متوسط	+	+	+	حساس	۸۰	۳۷۵	حساس
۵	مرد	متوسط	+	+	+	۶۴	۸۰	۳۷۵	مقاوم
۶	مرد	متوسط	+	-	+	۲۲	۸۰	۷۵۰	مقاوم
۷	مرد	قوی	+	+	+	حساس	۸۰	۳۷۵	حساس
۸	زن	قوی	+	+	+	۱۶	۸۰	۷۵۰	مقاوم
۹	زن	قوی	+	+	+	حساس	۴۰	۳۷۵	حساس
۱۰	زن	قوی	+	+	+	حساس	۴۰	۳۷۵	حساس
۱۱	مرد	قوی	+	+	+	۱۲۸	۴۰	۷۵۰	مقاوم
۱۲	زن	قوی	+	+	+	۱۲۸	۸۰	۷۵۰	مقاوم
۱۳	مرد	متوسط	+	+	-	حساس	۸۰	۷۵۰	حساس
۱۴	مرد	قوی	+	+	+	حساس	۴۰	۳۷۵	حساس
۱۵	زن	قوی	+	+	+	حساس	۸۰	۳۷۵	حساس
۱۶	زن	قوی	+	+	+	حساس	۸۰	۷۵۰	حساس
۱۷	مرد	متوسط	+	+	-	۲۲	۸۰	۷۵۰	مقاوم
۱۸	مرد	قوی	+	+	+	۶۴	۸۰	۷۵۰	مقاوم
۱۹	زن	متوسط	+	+	+	حساس	۸۰	۷۵۰	حساس
۲۰	زن	قوی	+	+	+	حساس	۸۰	۳۷۵	حساس
۲۱	مرد	ضعیف	+	-	-	۶۴	۸۰	۷۵۰	مقاوم
۲۲	مرد	قوی	+	+	+	حساس	۴۰	۳۷۵	حساس
۲۳	زن	قوی	+	+	+	حساس	۴۰	۳۷۵	حساس
۲۴	مرد	قوی	+	+	+	حساس	۸۰	۷۵۰	حساس
۲۵	زن	قوی	+	+	+	حساس	۸۰	۳۷۵	حساس
۲۶	مرد	ضعیف	+	-	-	۶۴	۸۰	۷۵۰	مقاوم
۲۷	زن	قوی	+	+	+	حساس	۴۰	۳۷۵	حساس
۲۸	زن	قوی	+	+	+	۱۶	۸۰	۷۵۰	مقاوم
۲۹	مرد	متوسط	+	+	+	حساس	۸۰	۳۷۵	حساس
۳۰	مرد	متوسط	+	+	+	۶۴	۴۰	۷۵۰	مقاوم
۳۱	مرد	متوسط	+	-	+	۲۲	۸۰	۷۵۰	مقاوم

۳۲	مرد	متوسط	+	+	-	۲۲	۸۰	۷۵۰	مقاوم
۳۳	مرد	قوی	+	+	+	۲۲	۸۰	۷۵۰	مقاوم
۳۴	مرد	قوی	+	+	+	۶۴	۸۰	۷۵۰	مقاوم
۳۵	زن	قوی	+	+	+	۱۲۸	۸۰	۷۵۰	مقاوم
۳۶	مرد	متوسط	-	-	-	۶۴	۸۰	۷۵۰	مقاوم
۳۷	مرد	قوی	+	+	+	۱۲۸	۴۰	۷۵۰	مقاوم
۳۸	زن	متوسط	+	+	+	حساس	۸۰	۷۵۰	حساس
۳۹	زن	ضعیف	-	-	-	حساس	۸۰	۷۵۰	حساس
۴۰	مرد	متوسط	+	+	-	حساس	۸۰	۷۵۰	حساس

جدول شماره ۴: ارتباط بین شدت بیوفیلیم با مقاومت به ایمی پنم و حضور ژن های دخیل در تولید بیوفیلیم

شدت بیوفیلیم (تعداد)	ایمی پنم (تعداد)		algD		pslD		Pelf	
	مقاوم	حساس	مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی
قوی (۲۲)	۱۰	۱۲	۲۲	۰	۲۲	۰	۲۲	۰
متوسط (۱۴)	۸	۶	۱۲	۲	۱۰	۴	۱۰	۴
ضعیف (۴)	۲	۲	۲	۲	۰	۴	۰	۴
P-Value	۰/۸۹		۰/۸۵		۰/۰۰۴		۰/۰۰۴	
مجموع (۴۰)	۲۰	۲۰	۳۶	۴	۳۲	۸	۳۲	۸

اگرچه مکانیسم‌های باکتریایی مقاومت در برابر پپتیدهای ضد میکروبی نیز توضیح داده شده است، اما به طور کلی توافق شده است که سرعت توسعه مقاومت در برابر آنها بسیار کمتر از آنتی بیوتیک‌های معمولی است، که نوید بخش استفاده از این پپتیدها در برابر انواع مختلف عفونت‌ها است (۱۶). در مان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروزیوزا به عنوان یکی از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی به دلیل مقاومت ذاتی و اکتسابی ناشی از ژنوم این سویه باکتری و سایر عناصر ژنتیکی قابل انتقال دشوار است (۱۷).

مطالعات در زمینه مقاومت آنتی بیوتیکی در بین ایزوله های سودوموناس آئروزیوزا در نواحی مختلف دنیا نشان می‌دهد که اکثر این ایزوله‌ها به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام، ایمی پنم، مروپنم و آمیکاسین مقاوم هستند و ایزوله‌های مقاوم به چند

بحث

امروزه مقاومت میکروارگانیزم‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به یکی از جدی‌ترین معضلات بهداشت جهانی تبدیل شده است. در حال حاضر این مشکل دیگر منحصر به پاتوژن‌های بیمارستانی نیست، بلکه سویه‌های غیربیمارستانی متعددی نیز به وجود آمده‌اند که درمان آنتی‌بیوتیکی مناسبی برای آنها یافت نمی‌شود (۱۴). یکی از تلاش‌های اخیر محققان برای غلبه بر این چالش‌ها استفاده از فناوری نانو و همچنین پپتیدهای ضد میکروبی می‌باشد. مواد در مقیاس نانو، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی از جمله نسبت سطح به حجم بالاتر، خصوصیات الکتریکی، مغناطیسی، نوری تغییر یافته و واکنش‌پذیری بالاتر دارند (۱۵).

دلایل این مقاومت می‌توان به وجود غشای خارجی با نفوذپذیری پایین، بیان بیشتر پمپ‌های خارج کننده چند دارویی، آنزیم‌های هیدرولیزکننده و تنظیم کاهش پورین‌های غشای خارجی و همچنین کسب عوامل مقاومت در حین در مان عفونت‌های ناشی از این میکروارگانیسم اشاره کرد (۲۴).

در مطالعه یوسفی و همکاران مشاهده شد که فنوتیپ MDR، حضور اینتگرون کلاس ۱ و بستری شدن در بخش ICU و سوختگی به طور معنی‌داری با ایزوله‌های مقاوم به ایمی پنم مرتبط هستند (۲۵). پپتید ضد میکروبی IDR1018 که در این مطالعه به کار برده شد در غلظت‌های بین ۴۰ تا ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر روی ایزوله‌های بالینی و استاندارد سودوموناس آئروژینوزا اثرگذار بود. اثر ضد میکروبی پپتید IDR1018 در مطالعات دیگر بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۶).

پپتید ضد بیوفیلیم IDR-1018 دارای اثر علیه گونه‌های متعدد باکتری شامل باکتری‌های گرم مثبت سودوموناس آئروژینوزا، اشر شیاکلی، سینتوباکتر بومانی، کلبسیلا پنومونیه، سالمونلا تیفی موریوم و باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در غلظت‌های کمتر از MIC می‌باشد (۲۷). این پپتید برای دو سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923 و انتروکوکوس فکالیس ATCC19433 برابر با ۲۵۶ $\mu\text{g/ml}$ گزارش شده است. پپتید IDR1018 علاوه بر اثر آنتی میکروبی و کاهش بیوفیلیم دارای خاصیت ایمنومودولاتوری نیز می‌باشد (۹).

نانوذرات کیتوزان به عنوان عامل ضد میکروبی دیگر مورد استفاده در این مطالعه دارای اثر ضد میکروبی در رنج بین ۳۵۰ تا ۷۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر روی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا بود. تاثیر آنتی میکروبی نانوذرات کیتوزان نیز بر روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی و همچنین قارچ‌ها به اثبات رسیده است (۲۸).

کیتوزان مورد استفاده در مطالعه فعلی دارای وزن مولکولی پایین بود و ارزیابی نانوذرات کیتوزان سنتز شده توسط DLS

دارو (MDR) در بین این سویه‌ها افزایش چشمگیری داشته است (۱۸). توانایی تشکیل بیوفیلیم در سودوموناس آئروژینوزا از دیگر عوامل مقاومت در برابر در مان آنتی بیوتیکی و موارد عود عفونت می‌باشد.

در مطالعه حاضر تشکیل بیوفیلیم در تمام ایزوله‌ها مشاهده شد و اکثر ایزوله‌ها دارای تولید بیوفیلیم با شدت قوی بودند که این نتایج در تطابق با سایر مطالعات بود (۱۹، ۲۰). سه ژن *algD*، *pelF* و *pslD* سبب بیان پروتئین‌هایی می‌شوند که در ایجاد ماتریکس بیوفیلیم در سودوموناس آئروژینوزا نقش مهمی ایفا می‌کنند. نتایج PCR نشان داد که فراوانی ژن‌های *algD*، *pslD* و *pelF* در بین سویه‌های حساس و مقاوم سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۹۰٪، ۸۰٪ و ۷۵٪ می‌باشد. حضور این سه ژن در مطالعه حاضر دارای فراوانی بالایی بود در صورتیکه در مطالعات دیگر به صورت متفاوت گزارش شده است و دلیل این تناقض را می‌توان به کلون‌های رایج متفاوت در هر منطقه ارتباط داد (۱۲، ۲۱).

در این مطالعه بین تولید بیوفیلیم با شدت قوی و متوسط و حضور ژن‌های *pslD* و *pelF* ارتباط معناداری مشاهده گردید. در مطالعات دیگر نیز بین حضور این ژن‌ها با تولید بیوفیلیم ارتباط معناداری گزارش شده است (۲۲، ۲۳). در مطالعه حاضر علی‌رغم عدم حضور این سه ژن در برخی از ایزوله‌ها مشاهده گردید که تمام ایزوله‌ها قادر به تولید بیوفیلیم می‌باشند و این ممکن است به دلیل نقش ژن‌ها و فاکتورهای دیگر در تولید بیوفیلیم سودوموناس آئروژینوزا باشد. در این مطالعه ۹۰٪ ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمی پنم دارای MIC معادل ۸۰ $\mu\text{g/ml}$ برای پپتید و ۷۵۰ $\mu\text{g/ml}$ برای نانوذرات کیتوزان بودند، در حالی که ۷۰٪ ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا حساس به ایمی پنم دارای MIC معادل ۸۰ $\mu\text{g/ml}$ برای پپتید و ۶۰٪ دارای MIC معادل ۳۷۵ $\mu\text{g/ml}$ برای نانوذرات کیتوزان بودند. بر اساس نتایج به دست آمده چنین به نظر می‌رسد که ایزوله‌های مقاوم در برابر ایمی پنم دارای مقادیر بالاتری از MIC برای نانوذرات کیتوزان و پپتید هستند. از جمله

باکتری‌ها نقش داشته باشند. از طرفی نانوذرات حاوی فعالیت آنتی میکروبی مانند کیتوزان به طور چشمگیری مورد استفاده هستند. مهمترین مزیت در رابطه با این نانوذرات طبیعی بودن آنها می‌باشد که کاربرد آنها را در شرایط *in vivo* بدون ایجاد اثرات جانبی فراهم می‌کند. نتایج این مطالعه نشان داد که پپتید ضد بیوفیلم IDR-1018 و نانوذرات کیتوزان به تنهایی و یا در ترکیب با آنتی بیوتیک‌ها می‌توانند بسیار موثر عمل کنند و کارایی آنتی بیوتیک را به طور قابل توجهی افزایش دهند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از پایان نامه دکترای تخصصی رشته میکروبیولوژی می‌باشد. بدین وسیله از مسئولان و کارشناسان انستیتو پاستور ایران و دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس که در این مطالعه شرکت و همکاری نمودند قدردانی می‌گردد.

تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

مشارکت نویسندگان:

(۱) مفهوم پردازی و طراحی مطالعه، یا جمع آوری داده‌ها، یا تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌ها: تمامی نویسندگان مشارکت داشتند.

(۲) تهیه پیش نویس مقاله یا بازبینی آن جهت تدوین محتوای اندیشمندانه: مهری حبیبی، محمدرضا اسدی کرم، آیدا حاجی حسین تبریزی

(۳) تایید نهایی دستنوشته پیش از ارسال به مجله: تمامی نویسندگان مشارکت داشتند.

و SEM نشان داد که نانوذرات با قطر ۲۳۲ نانومتر با پتانسیل زتا ۵۱ بدست آمده که به صورت کروی و بسیار یک دست بودند. این اندازه از نانوذرات کیتوزان با این بار سطحی در تطابق با مطالعات دیگر بود که پروتوکلهای مشابه را استفاده کرده بودند. بار مثبت سطحی در نانوذرات کیتوزان سبب افزایش بر هم کنش با دیواره باکتری به ویژه باکتری‌های گرم منفی‌ها می‌شود و عملکرد آن را بهبود می‌بخشد. در مطالعه ای دیگر که در تطابق با مطالعه فعلی بود حداقل غلظت مهاري نانوذرات کیتوزان در برابر ۳۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا تعیین شد. تاثیر نانوذرات کیتوزان در غلظت‌های sub-MIC بر تحرک، تشکیل بیوفیلم و سطوح بیان ژن‌های *RhlI* و *LasI* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آنها بیانگر تاثیر معنادار در مهار رشد باکتری در مقایسه با کنترل‌های ر شد یافته بدون نانوذرات بود (۲۹).

نتیجه‌گیری

درمان روتین عفونت‌های ادراری بر پایه استفاده از آنتی بیوتیک است. مطالعات اپیدمیولوژی در مناطق مختلف دنیا مقاومت بالا به آنتی بیوتیک‌ها را در بین سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا نشان میدهد و این مقاومت در حال افزایش است که می‌تواند آینده درمانی این عفونت‌ها را با معضل مواجه کند. قدرت تولید بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا در مان آنتی بیوتیکی را دشوارتر کرده است. به همین دلیل یافتن ترکیبات با تاثیر همزمان بر روی سلول‌های پلانکتونیک و بیوفیلم می‌تواند کمک کننده باشد. پپتیدهای ضد میکروبی می‌توانند به عنوان سلاح موثری در برابر میکروب‌ها از طریق چندین مکانیسم در کشتن

References

1. Sivick KE, Schaller MA, Smith SN, Mobley HL. The innate immune response to uropathogenic *Escherichia coli* involves IL-17A in a murine model of urinary tract infection. *The Journal of Immunology*. 2010;184(4):2065-75.
2. Klein RD, Hultgren SJ. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. *Nature Reviews Microbiology*. 2020;18(4):211-26.
3. Newman JW, Floyd RV, Fothergill JL. The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. *FEMS microbiology letters*. 2017;364(15).
4. Ciofu O, Tolker-Nielsen T. Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents—how *P. aeruginosa* can escape antibiotics. *Frontiers in microbiology*. 2019;9:13.
5. Colvin KM, Irie Y, Tart CS, Urbano R, Whitney JC, Ryder C, et al. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environmental microbiology*. 2012;14(8):1913-28.
6. Stapleton A. Prevention of recurrent urinary-tract infections in women. *The Lancet*. 1999;353(9146):7-8.
7. León-Buitimea A, Garza-Cárdenas CR, Garza-Cervantes JA, Lerma-Escalera JA, Morones-Ramírez JR. The demand for new antibiotics: antimicrobial peptides, nanoparticles, and combinatorial therapies as future strategies in antibacterial agent design. *Frontiers in microbiology*. 2020;16:69.
8. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of food microbiology*. 2010;144(1):51-63.
9. Mansour SC, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. Peptide IDR-1018: modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial infections. *Journal of Peptide Science*. 2015;21(5):323-9.
10. Reffuveille F, De La Fuente-Núñez C, Mansour S, Hancock RE. A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(9):5363-71.
11. Samet M, Ghaemi E, Jahanpur S, Jamalli A. Evaluation of biofilm-forming capabilities of urinary *Escherichia coli* isolates in microtiter plate using two different culture media. *International Journal Of Molecular And Clinical Microbiology*. 2013;3(1):244-7.
12. Banar M, Emaneini M, Satarzadeh M, Abdollahi N, Beigverdi R, Leeuwen WBv, et al. Evaluation of mannosidase and trypsin enzymes effects on biofilm production of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. *PloS one*. 2016;11(10):e0164622.
13. Ibrahim HM, El-Bisi MK, Taha GM, El-Alfy EA. Chitosan nanoparticles loaded antibiotics as drug delivery biomaterial. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2015;5(10):085-90.
14. Vincent J-L, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Jama*. 2009;302(21):2323-9.
15. Sahoo S, Parveen S, Panda J. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2007;3(1):20-31.
16. Kara S, Gökçeoğlu AU, Demirel ÖÖ, Koyuncu P. Evaluation of antimicrobial peptides

at the diagnosis of urinary tract infection in children. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2021;27(1):275-80.

17. Osundiya O, Oladele R, Oduyebo O. Multiple antibiotic resistance (MAR) indices of *Pseudomonas* and *Klebsiella* species isolates in Lagos University Teaching Hospital. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*. 2013;14(3):164-8.

18. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin T-J, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology advances*. 2019;37(1):177-92.

19. Kamali E, Jamali A, Ardebili A, Ezadi F, Mohebbi A. Evaluation of antimicrobial resistance, biofilm forming potential, and the presence of biofilm-related genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC research notes*. 2020;13(1):1-6.

20. Vasiljević Z, Jovčić B, Ćirković I, Đukić S. An examination of potential differences in biofilm production among different genotypes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Biological Sciences*. 2014;66(1):117-21.

21. Ghadaksaz A, Fooladi AAI, Hosseini HM, Amin M. The prevalence of some *Pseudomonas* virulence genes related to biofilm formation and alginate production among clinical isolates. *Journal of Applied Biomedicine*. 2015;13(1):61-8.

22. Cho HH, Kwon KC, Kim S, Park Y, Koo SH. Association between biofilm formation and antimicrobial resistance in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 2018;48(3):363-8.

23. Ma L, Jackson KD, Landry RM, Parsek MR, Wozniak DJ. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles

for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *Journal of bacteriology*. 2006;188(23):8213-21.

24. Moore NM, Flaws ML. Antimicrobial resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Laboratory Science*. 2011;24(1):47.

25. Yousefi S, Nahaei M, Farajnia S, Ghojzadeh M, Akhi M, Sharifi Y, et al. Class 1 integron and imipenem resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence and antibiotic susceptibility. *Iranian journal of microbiology*. 2010;2(3):115.

26. De la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Haney EF, Straus SK, Hancock RE. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS pathogens*. 2014;10(5):e1004152.

27. Klavs I, Lužnik TB, Škerl M, Grgič-Vitek M, Zupanc TL, Dolinšek M, et al. Prevalence of and risk factors for hospital-acquired infections in Slovenia—results of the first national survey, 2001. *Journal of hospital infection*. 2003;54(2):149-57.

28. Divya K, Vijayan S, George TK, Jisha M. Antimicrobial properties of chitosan nanoparticles: Mode of action and factors affecting activity. *Fibers and polymers*. 2017;18(2):221-30.

29. Fattah RAFA. Effect of chitosan nanoparticles on quorum sensing-controlled virulence factors and expression of LasI and RhII genes among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *AIMS microbiology*. 2021;7(4):415.

Evaluation of the effect of IDR-1018 antimicrobial peptide and chitosan nanoparticles on imipenem susceptible and resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with urinary tract infections from ICU

Aida Haji Hossein Tabrizi¹, Mehri Habibi^{2*}, Fatemeh Foroohi^{3*}, Taher Mohammadian⁴,
Mohammad Reza Asadi Karam⁵

1. Department of Microbiology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Molecular Biology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3. Department of Microbiology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4. Department of Microbiology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
5. Department of Molecular Biology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Corresponding author: Department of Molecular Biology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Email: m_habibi1362@yahoo.com

Abstract

Background & Aim: Excessive use of antibiotics has significantly increased resistance to common antibiotics in the treatment of urinary tract infections. In the present study, antimicrobial efficacy of chitosan nanoparticles and peptide IDR-1018 was evaluated against *P. aeruginosa* isolates.

Methods: In the present study, 20 resistant and 20 sensitive *P. aeruginosa* isolates to imipenem were collected from patients with urinary tract infections. The ability of biofilm formation and the presence of three genes involved in biofilm production including *algD*, *pslD* and *pelF* in the isolates were determined by crystal violet and PCR methods, respectively. The anti-bacterial effect of imipenem, antimicrobial peptide IDR-1018 and chitosan nanoparticles was evaluated by determining the MIC by microdilution broth method.

Results: The ability of biofilm formation in the isolates was weak (10%), moderate (35%) and strong (55%). The frequency of presence of three genes related to biofilm formation including *algD*, *pslD* and *pelF* was 90%, 80% and 75%, respectively. MIC values for the isolates were 16-168 µg/ml for imipenem, 40 and 80 µg/ml for peptide IDR-1018, 750 and 375 µg/ml for chitosan nanoparticles, respectively.

Conclusion: Finding alternative approaches such as antimicrobial peptides and nanoparticles can be effective in treatment of *P. aeruginosa* infections. The results of our study showed that peptide IDR-1018 and chitosan nanoparticles alone or in combination with imipenem can be considered as a treatment strategy.

Keywords:

Urinary tract infection,
Pseudomonas aeruginosa,
Antibiotic resistance,
Chitosan nanoparticles,
Peptide IDR-1018

How to Cite this Article: Haji Hossein Tabrizi A, Habibi M, Foroohi F, Mohammadian T, Asadi Karam MR, Adib Hajbaghe M, Dianati M. Evaluation of the effect of IDR-1018 antimicrobial peptide and chitosan nanoparticles on imipenem susceptible and resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with urinary tract infections from ICU. Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2022;10(2):1-12.

distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cite.