



Scan online to view this article

The effect of silver nanoparticles on *mecA* gene expression in methicillin-resistant samples of *Staphylococcus aureus*

Ahmad Rashid, Farahnaz Molavi*, Homa Mahmoudzadeh

Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Abstract

Aim and Background: *Staphylococcus aureus* is a common cause of nosocomial infections and increased resistance to antimicrobial agents in this bacterium is one of the major problems in health care. We also see resistant strains of this bacterium that are important pathogens in the development of the disease. The control of these bacteria is very important from a health and economic point of view, so the aim of this study was to investigate the prevalence of methicillin *mecA* resistance gene and determine the pattern of antibiotic resistance in existing samples of *Staphylococcus aureus* and to evaluate the antibacterial activity of silver nanoparticles against Gram-positive *Staphylococcus aureus*.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, 59 *staphylococcus aureus* specimens were collected from 11 nature detection laboratories. These samples were identified using standard laboratory methods and specific culture. PCR was used to evaluate the frequency of *mecA* gene. In order to use the antibiotic susceptibility pattern of the strains, the disk diffusion method is performed based on the CLSI protocol. Silver nanoparticles were made from ginger extract and Real Time PCR was used to evaluate the effect of silver nanoparticles on *mecA* gene expression.

Results: Out of 59 samples of *Staphylococcus aureus*, 51 samples were resistant to methicillin. Phenotypic evaluation of antibiotic resistance pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains showed that the results showed that 90% of isolates to penicillin, 85% to erythromycin, 84% to ceftriaxone, 53% to amikacin, 49% to gentamicin, 47% to piracyl 45% were resistant to spirofloxacin 37% to imipetmo 35% to linezolid, ie the highest antibiotic resistance was to penicillin 90%, erythromycin 85% and the lowest to imipetmo 37% and linzolid 35, respectively. Molecular analysis showed the presence of *mecA* gene in all samples. The results of real-time study showed that the effect of nanoparticles on *mecA* gene expression is significant.

Conclusion: The presence of 51 resistant samples out of 59 samples in the present study indicates an increase in resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to other antibiotics, which is a serious warning for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections. And the effectiveness of silver nanoparticles on *mecA* gene expression shows that we can use this substance instead of existing antibiotics.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Methicillin, silver nanoparticles, antibiotic resistance, *mecA* gene

Corresponding author:

Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Email: farahmolavi@gmail.com

برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

بررسی اثر نانوذرات نقره بر روی بیان ژن *mecA* در نمونه‌های مقاوم به متی‌سیلین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس احمد رشید، فرحناز مولوی*، هما محمودزاده

گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: باکتری استافیلوکوکوس اورئوس یک عامل شایع در عفونت‌های بیمارستانی است و افزایش مقاومت به عوامل ضد میکروبی در این باکتری یکی از مشکل‌های عمده بخش مراقبت‌های بهداشتی است هم‌چنین ما شاهد سویه‌های مقاوم شده این باکتری هستیم که پاتوژن‌های مهم در بروز بیماری و مرگ و میر هستند لذا کنترل این باکتری‌ها از نظر بهداشتی و اقتصادی اهمیت زیادی دارند. هدف از این تحقیق، بررسی میزان شیوع ژن مقاومت به متی‌سیلین *mecA* و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در نمونه‌های موجود استافیلوکوکوس اورئوس و بررسی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی - توصیفی ۵۹ استافیلوکوکوس اورئوس از ۱۱ آزمایشگاه تشخیص طبی جمع آوری گردید. این نمونه‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد آزمایشگاهی و کشت اختصاصی تعیین هویت شدند. برای بررسی فراوانی ژن *mecA* از روش PCR استفاده شد. به منظور ارزیابی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، از روش انتشار دیسک بر اساس پروتکل CLSI انجام گردید. نانوذره نقره توسط عصاره زنجبیل ساخته شد و برای بررسی اثر نانوذره نقره بر بیان ژن *mecA* از روش Real time PCR استفاده شد.

یافته‌ها: از ۵۹ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم ۵۱ نمونه به متی‌سیلین بودند. ارزیابی فنوتیپی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین نشان داد که ۹۰ درصد جدایه‌ها به پنی‌سیلین، ۸۵ درصد به اریترومايسين ۸۴ درصد به سفتریاکسون ۵۳ درصد به آمیکاسین، ۴۹ درصد به جنتامایسین، ۴۷ درصد به پیراسیلین، ۴۵ درصد به سپیروفلوکساسین ۳۷ درصد به ایمی‌پتمو ۳۵ درصد به لینزولید مقاومت داشتند یعنی بیش-ترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب متعلق به پنی‌سیلین ۹۰ درصد، اریترومايسين ۸۵ درصد و کم‌ترین نسبت به ایمی‌پتمو ۳۷ درصد و لینزولید ۳۵ بود. بررسی مولکولی نشان دهنده حضور ژن *mecA* در تمام نمونه‌ها بود. و نتیجه بررسی ریل‌تایم نشان داد که تأثیر نانوذره بر روی بیان ژن *mecA* معنادار است ($P < 0/01$).

نتیجه‌گیری: وجود ۵۱ نمونه مقاوم از ۵۹ نمونه در مطالعه حاضر نشان دهنده افزایش مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بوده که این مسئله یک هشدار جدی جهت درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس است. و مؤثر بودن نانوذره نقره بر بیان ژن *mecA* نشان می‌دهد که به این ماده می‌توان به‌عنوان یک جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌های موجود فکر کرد.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، متی‌سیلین، نانوذره نقره، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ژن *mecA*

مقدمه

نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

پست الکترونیکی: farahmolavi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۲

می کند که میل پیوندی پایینی برای آنتی بیوتیک های بتالاکتام دارد. لازم است بدانید که پروتئین های PBP در ساخت و ساز دیواره سلولی باکتریایی نقش دارند. از این رو، وجود چنین پروتئین جدیدی تحت تأثیر آنتی بیوتیک نخواهد بود و باکتری به راحتی به زندگی خود ادامه می دهد. این سویه ها در اصطلاح *استافیلوکوکوس* های مقاوم به متی سیلین نامیده می شوند. نانوذرات گروهی از اتم ها، یون ها یا مولکول هایی هستند که اندازه آن ها بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر باشد و به دلیل کوچکی سایز قادر هستند که در شکاف های مولکول - های کوچک نفوذ کنند و ایجاد گسستگی در آن ها نمایند (۶) لذا نانوذرات را می توان نسل جدیدی از آنتی بیوتیک های آینده به حساب آورد (۷). هدف از تحقیق پیش رو شناسایی ژن *mecA* و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و بررسی اثر نانوذره بر روی بیان ژن *mecA* است.

مواد و روش ها

این مطالعه که به صورت توصیفی-مقطعی^۶ و در یک بازه زمانی ۷ ماهه (۱۳۹۸-۱۳۹۹) انجام شد، تعداد ۵۹ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* از ۱۱ آزمایشگاه سطح شهر مشهد جمع آوری شد. پس از انتقال سویه - ها که بر روی محیط آگار، کشت داده شده بود به آزمایشگاه تحقیقات گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، جهت شناسایی نمونه ها از تست های استاندارد شامل رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، کواگولاز لوله ای و لای، رشد در مانیتول سالت آگار و DNase استفاده شد (۸). باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* استاندارد (ATCC=25923) از آزمایشگاه استاندارد ایران تهیه شد.

به منظور بررسی مقاومت به متی سیلین و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی از محیط مولر هینتون آگار و روش انتشار دیسک در آگار استفاده شد (۹). دیسک - های آنتی بیوتیک استفاده شده در این مطالعه شامل: پنی سیلین ۳۰ μg، سیپروفلوکساسین ۱۰ μg، جنتامایسین ۱۰ μg، لینزولید ۲۰ μg، اریترومایسین

استافیلوکوکوس اورئوس^۱ که به *استافیلوکوکوس* طلائی نیز شهرت دارد یک کوکسی گرم مثبت و بی - هوازی اختیاری است و از نظر پزشکی مهم ترین گونه این جنس محسوب می شود (۱) *استافیلوکوکوس اورئوس* ممکن است در حالت عادی روی پوست انسان یا سایر پستانداران یک همزیست باشد که در این حالت عفونت ایجاد نمی کند (۲). ولی اگر پوست آسیب ببیند این باکتری می تواند به بافت ها نفوذ کرده و عفونت های شدیدی ایجاد کند. این باکتری یکی از عوامل مهم عفونت ها در بیمارستان و یکی از عوامل اصلی بیماری زا در انسان محسوب شود به طوری که در حال حاضر یک نگرانی عمده برای سلامت عمومی جامعه محسوب می شود که می تواند با درگیر کردن قسمت های مختلف بدن از جمله دستگاه تنفس باعث صرف هزینه های فراوان و طولانی شدن دوره درمان بیمار شود (۳). هم چنین این باکتری سبب بیماری - های خطرناک از جمله زرد زخم تاولی، سندرم فلسی شدن پوست^۲، سندرم رایتر و سندرم شوک توکسیک^۳ به ویژه در کودکان و افرادی که ضعف سیستم ایمنی دارند، می شود (۴). از مهم ترین مشکلات در درمان عفونت های *استافیلوکوکوس* بروز مقاومت آنتی - بیوتیکی و پتانسیل کسب ژن های خارجی در جهت بروز این مقاومت ها در آن ها است بنابراین سویه های مقاوم به متی سیلین *استافیلوکوکوس اورئوس* یا MRSA^۴ تهدید جدی در کنترل عفونت های اکتسابی از بیمارستان و جامعه به شمار می آیند و روند درمان عفونت های این باکتری را با مشکل مواجه می سازند (۵). مقاومت به متی سیلین و سایر پنی - سیلین های مقاوم به پنی سیلیناز به دلیل اپرون *mec* است. این اپرون، بخشی از کاست کروموزومی *استافیلوکوکوس*^۵ است. ژن *mecA*، پروتئین متصل شونده به پنی سیلین با نام PBP2a را کد

¹ *Staphylococcus aureus*

² scalded skin syndrome

³ TST

⁴ Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*

⁵ SCCmec

⁶ sectional-Cross

Archive of SID

دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با پنس استریل در سطح محیط قرار گرفت به طوری که فاصله دیسک‌ها از لبه پلیت ۱/۵ سانتی‌متر و نسبت به هم ۲/۵ سانتی‌متر بود. سپس پلیت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از این مدت اطراف دیسک‌ها از لحاظ هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفتند (قطر ناحیه اطراف دیسک توسط خط کش مخصوص^۱ اندازه‌گیری و با مراجعه به جداول کمیته ملی معیارهای آزمایشگاهی بالینی^۲ حساسیت یا مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های رایج تعیین گردید. در نهایت پس از ۲۴ ساعت انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حداقل غلظت بازدارندگی رشد^۳ باکتری تعیین شد. برای این منظور همانند روش دیسک دیفیوژن سوسپانسیون تهیه شده و کدورت آن را برابر با نیم‌مک فارلند قرار داده و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت سفره‌ای داده شد.

استخراج RNA

استخراج RNA بعد از تیماردهی سوسپانسیون باکتری دارای ژن *mecA* با نانوذره نقره (با رقت بعد از حداقل غلظت بازدارندگی رشد) انجام شد. استخراج RNA با استفاده از کیت مخصوص (۵۲۹۲) شرکت پارس طوس زیست فناوری، انجام و پس از آن غلظت و جذب نوری تمامی RNA های استخراج شده با کمک نانودراپ (Nanodrop Bio Tek Epoch, USA) اندازه‌گیری شد.

ساخت: پس از تعیین مقدار و غلظت RNA ساخته شده، برای ساخت cDNA از RNA استخراج شده از کیت مخصوص (A101161) شرکت پارس طوس زیست فناوری استفاده شد.

PCR ژن *mecA*

۲µg، ایمیتو ۵µg و سفوکسیتین ۳۰µg بود که از شرکت پادتن طب تهیه شد. این مرحله براساس دستورالعمل استاندارد آزمایشگاه (۱۰) انجام شد.

ساخت نانوذره نقره

۵ گرم زنجبیل آسیاب شده را در ۵۰ سی‌سی آب مقطر حل کرده (در این روش برای هر گرم پودر گیاه ۱۰ سی‌سی آب مقطر استریل اضافه می‌شود) و ۱۵ دقیقه جوشیده شد. بعد محلول در ویال ۵۰ میلی-لیتری ریخته شد و ۱۲ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ، محلول فوقانی به یک پلیت منتقل گردید و پس از فیلتر شدن این محلول در ۲۰ سانتی‌متری آتش، ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره فیلتر شده زنجبیل را در ویال ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و ۱۰ میکرولیتر از محلول نیترات نقره ۱ میلی‌مولار به آن اضافه شد. بعد از تغییر رنگ، محلول در میکروتیوپ-های ۲ میلی‌لیتری ریخته شده و با دور ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی دور ریخته شد و ۲ میلی‌لیتر آب دیونیزه یا آب مقطر به آن اضافه گردید و مجدد سانتریفیوژ شد بعد ۳ بار تکرار این مرحله، رسوب انتهایی را در پلیت‌های جداگانه ریخته و در محل تاریک گذاشته تا خشک شود و پودر نانوذره آماده گردد. برای بررسی خصوصیت فیزیکی نانوذره به دست آمده از روش‌های عکس‌برداری میکروسکوپ الکترونی عبوری (دانشگاه فردوسی مشهد)، FTIR (دانشگاه آزاد واحد مشهد) و دستگاه طیف سنج پراش پرتو ایکس XRD (دانشگاه فردوسی مشهد) استفاده شد.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی

برای این منظور نمونه‌ها با استفاده از دیسک دیفیوژن در محیط جامد یا روش کربی بائر و طبق دستورالعمل استاندارد CLSI بررسی شدند (۱۱) برای این منظور، از باکتری‌های رشد کرده سوسپانسیونی معادل ۰/۵ مک‌فارلند تهیه گردید و بر روی محیط مولر هینتون آگار به صورت کشت سفره‌ای کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند تا باکتری‌ها با شرایط جدید سازگاری یابند. پس از آن

¹ Antibiotic Zone Scale ruler

² Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)

³ Minimum Inhibitory of Concentration: MIC

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با استفاده از کیت مخصوص دنا زیست (مسترمیکس سایبرگرین ریل‌تایم RealQ Plus 2x Master Mix Green) به صورت زیر انجام شد: ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس، پرایمر رفت ۱۰ میکرومولار به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، پرایمر برگشت ۱۰ میکرومولار به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، نمونه ۵ نانوگرم cDNA و آب فاقد نوکلئاز تا رساندن حجم تا ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. تکثیر قطعه‌ای مورد نظر در دستگاه Applied Biosystems StepOnePlus با برنامه واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه، تکثیر شامل واسرشت در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۴۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن srna ۱۶ به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. برای محاسبه میزان بیان نسبی ژن، آنالیز داده‌ها و رسم نمودارهای مربوطه از LightCycler Relative Quantification Software استفاده شد. داده‌های مربوط به تغییر بیان ژن *mecA* با روش $2\Delta\Delta CT$ با فرض کارایی ۱۰۰ درصد و با استفاده از آزمون آماری T مستقل در دو گروه آنالیز شد.

جدول ۱: توالی الیگونوکلوئیدی پرایمرهای استفاده شده در تکثیر ژن *mecA* در استافیلوکوکوس اورئوس و ژن 16S Rrna (۱۲)

ژن	توالی نوکلئوتیدی
<i>mecA</i>	F: AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC R: AGTTCGTCAGTACCGGATTTGC
16S rRNA	F: CCCAACCCCTTTTCCTTACTTGC R: CATCAACTTCACCTTCACGC

نتایج

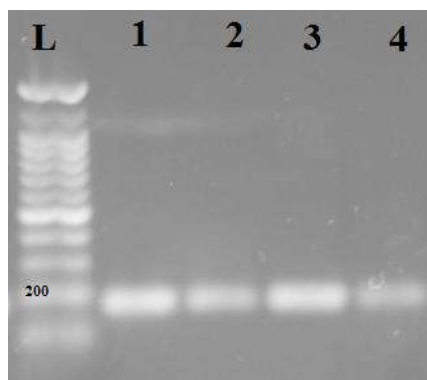
در این مطالعه مقطعی توصیفی ۵۹ نمونه مورد بررسی قرار گرفت و شناسایی آن‌ها توسط تست‌های تشخیصی میکروبیولوژی و بیوشیمیایی تأیید شدند و از بین آن‌ها ۵۱ نمونه‌ها دارای ژن *mecA* بودند و از لحاظ فنوتیپی به متی‌سیلین مقاومت نشان دادند. شکل شماره ۱ نتیجه محصول PCR ژن *mecA* بعد از انجام الکتروفورس است. وجود باند ۱۹۸ جفت بازی نشان‌دهنده مثبت بودن از نظر وجود ژن *mecA* است.

پس از BLAST پرایمرهای سنتز شده توسط نرم‌افزار اولیگو (oligo 7.60) در سایت NCBI، واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. در این واکنش، ۱ میکرولیتر از cDNA الگو، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA Polymerase (۵ واحد در میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۲۰ پیکومول در میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر از مخلوط دزوکسی نوکلئوتیدهای تری‌فسفات (۲/۵ میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (x10) و ۱/۵ میکرولیتر از نمک MgCl₂ (۵۰ میلی‌مولار) با یکدیگر مخلوط شده، حجم نهایی با آب دوبار تقطیر شده به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. واکنش در ۳۳ سیکل با برنامه دمایی، دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۶ دقیقه برای ۳۴ سیکل در شرایط زیر عبارتند از: واسرشته شدن^۱ ۹۵ درجه سلسیوس ۵ دقیقه، اتصال پرایمر^۲ ۵۷ درجه برای ۵۰ ثانیه، طولیل شدن^۳ ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس برای ۶ دقیقه انجام شد.

جهت بررسی کیفیت محصول PCR، محصول بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورس در بافر TBE به مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورس شد (۱۲). برای رنگ آمیزی ژل، آن‌را به مدت ۱۵ دقیقه در تانک حاوی اتیدیوم بروماید قرار داده و نتایج را توسط دستگاه Geldocument با نور فرابنفش مورد مطالعه قرار گرفت. از نشانگر Cat. No. PR911653.100bp شرکت سیناکلون برای تخمین اندازه قطعه‌ها استفاده شد. میزان تغییر بیان ژن با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 و آزمون One way ANOVA تجزیه و تحلیل شد در تمام موارد سطح معنی‌داری $p < 0/01$ در نظر گرفته شد.

سنجش بیان ژن توسط تکنیک Real-Time PCR

¹ Denaturation
² Annealing
³ Extension



شکل ۱: نتایج الکتروفورز حاصل تکثیر ژن *mecA* (از چپ به راست: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، کنترل مثبت، نمونه‌های مثبت حاوی ژن *mecA*، طول قطعه موردنظر ۱۹۸ جفت باز است)

تعیین حساسیت میکروبی

نقره برای تمامی نمونه‌های تحت آزمایش مشاهده شد و محلول حاوی نانوذرات نقره دارای فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های آزمایش بود و هاله قابل تشخیص که حاصل جلوگیری از رشد میکروب توسط نانوذرات نقره است در تمام تیمارهای اصلی در مقایسه با نمونه‌های شاهد که عصاره، آب مقطر و نیترات نقره بودند مشاهده شد.

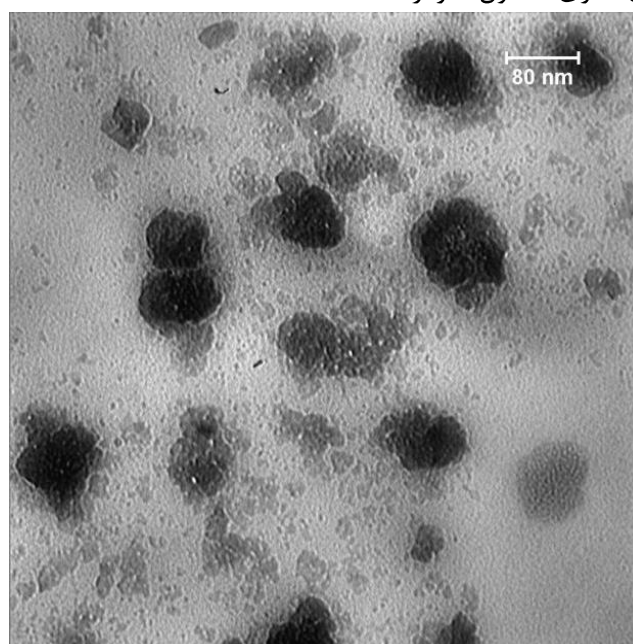
نتایج نشان داد ۹۰ درصد جدایه‌ها به پنی‌سیلین، ۸۵ درصد به اریترومايسين ۸۴ درصد به سفتریاکسون ۵۳ درصد به آمیکاسین، ۴۹ درصد به جنتامایسین، ۴۷ درصد به پیراسیلین، ۴۵ درصد به سپیروفلوکساسین ۳۷ درصد به ایمپتیمو ۳۵ درصد به سلفامتوکسازول مقاومت داشتند یعنی بیش‌ترین میزان مقاومت آنتی-بیوتیکی به ترتیب متعلق به پنی‌سیلین (۹۰ درصد)، اریترومايسين ۸۵٪ و کم‌ترین لینزولید بود.

بررسی ریخت-شناسی نانوذره نقره سنتز شده

بررسی نانوذره نقره با میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد که نانوذرات تولیدی اکثراً شکل مکعبی با اندازه ۲۲/۳۹ تا ۹۳/۳۵ نانومتر و تعداد بسیار کمی به صورت مثلثی و میله‌ای هستند (شکل ۲).

بررسی خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره

فعالیت ضد میکروبی نانوذره نقره تولید شده از عصاره زنجبیل با مشاهده و اندازه‌گیری هاله محدودیت رشد باکتری در اطراف دیسک‌های حاوی محلول نانوذرات

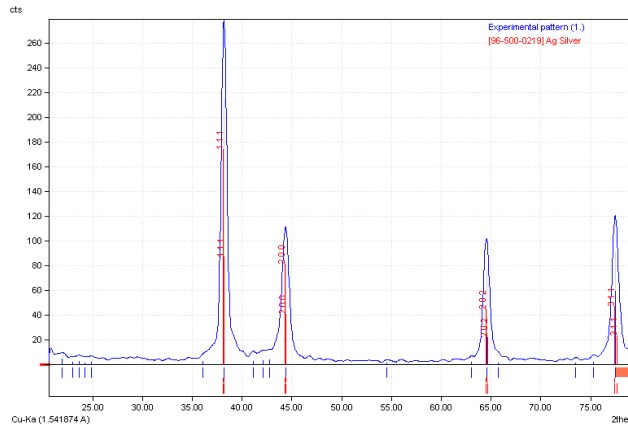


شکل ۲: تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از نانوذره نقره ساخته شده

مطالعه XRD

۹۹/۶۴، ۷۸/۸^۰ بوده که وجود نانوکریستال‌های نقره را ثابت می‌کند. همچنین نتایج نشان داد که اکثر نانوذرات شکل مکعبی داشتند و ۴ پیک جذبی در آن-ها تشخیص داده شد (شکل ۳).

بر اساس شکل ۳ الگوی پراش اشعه ایکس (XRD)، اندیس‌های میلر در سطوح ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۰۲ و ۳۱۱ بوده و به ترتیب مربوط به زاویه‌های 0° ، $37/5^{\circ}$ ، $44/3^{\circ}$

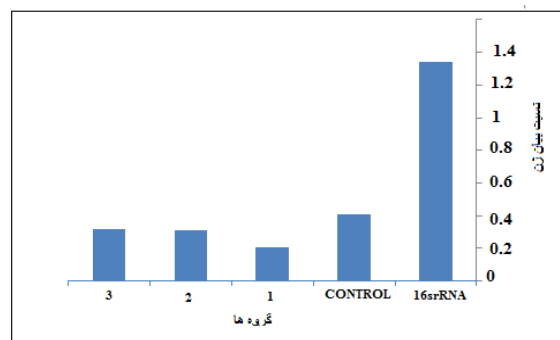


شکل ۳: الگوی پراش اشعه ایکس بر نانوذره نقره ساخته شده در پژوهش

و از نظر آماری تفاوت معناداری در مقایسه با بیان ژن *16SrRNA* از خود نشان دادند ($P < 0.05$) (شکل ۴). منحنی ذوب تعیین کننده عدم جفت شدن آغازگرها، تکثیر اختصاصی قطعه‌های ژنی موردنظر و عدم تکثیر قطعه‌های غیراختصاصی برای هر ژن را در شکل ۵ نشان می‌دهد.

بیان ژن *mecA* بعد از تیمار با مهارکننده نانوذره نقره

برای مقایسه اثر نانوذره نقره بر بیان ژن *mecA* بعد از استخراج RNA و سنتز cDNA بیان ژن به صورت کمی با استفاده از روش Real Time PCR بررسی شد، نتایج این روش نشان داد که سویه‌های مختلف تحت تأثیر نانوذرات نقره تغییر بیان متفاوتی را داشتند

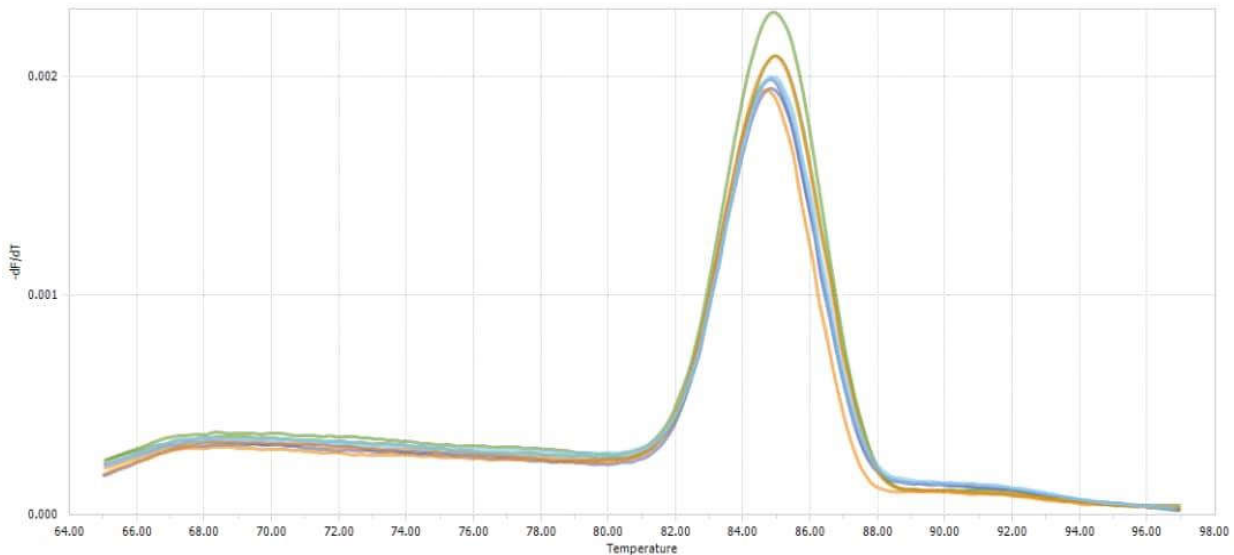


شکل ۴: میزان بیان ژن *mecA* در سویه‌های تیمار شده با نانوذرات نقره.

استافیلوکوکی استفاده می‌شد اما روز به روز به مقاومت آنتی‌بیوتیکی علیه پنی‌سیلین افزوده شد به طوری که در سال ۱۹۵۰، ۴۰ درصد سویه‌های بیمارستانی به پنی‌سیلین مقاوم شدند و این میزان در سال ۱۹۶۰ به ۸۰ درصد رسید. علت این پدیده تولید پنی‌سیلیناز توسط باکتری بود که پنی‌سیلین را تجزیه می‌کند؛

بحث و نتیجه گیری

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از پاتوژن مطرح در سطح جهانی است و به عنوان دومین باکتری در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی مطرح است. پس از کشف پنی‌سیلین، در ابتدا از این دارو برای درمان عفونت‌های



شکل ۵: آنالیز منحنی ذوب (Melting curve) برای اطمینان از اختصاصی بودن قطعه‌های تکثیر شده ژن *mecA* که منحنی ژن مورد سنجش در تمام نمونه‌ها با هم منطبق و به صورت یک قله است.

سال ۲۰۱۸ (۱۸)، زمانی در سال ۲۰۰۷ (۱۹) و Moradi در سال ۲۰۱۱ (۲۰) نیز گزارش شده بود. هم‌چنین Shokri و همکارانشان در سال ۱۳۹۳ با بررسی ۱۷۶ نمونه بالینی جمع‌آوری شده از بخش‌های مختلف بیمارستان آیت ا... موسوی زنجان، نشان دادند که کمابیش تمام نمونه‌های مورد مطالعه این بیمارستان دارای مقاومت به متی‌سیلین بودند (۲۱) این نتایج نشان می‌دهند که افزایش مقاومت به آنتی-بیوتیک همواره یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشت جهانی بوده است اینک به تهدیدی روزافزون مبدل گردیده و توسعه راهکاری جدید برای غلبه بر این مشکل نیازی حیاتی است.

یکی از راه‌های امیدوارکننده برای از بین بردن مقاومت‌های باکتریایی، استفاده از نانوذرات فلزی است (۲۲).

نانوذرات به دلیل اندازه کوچک و سطح تماس بالایی که با محیط و میکروارگانیسم‌ها دارند می‌توانند باعث افزایش فعالیت بیولوژیک و شیمیایی آن‌ها شوند. همین امر موجب می‌گردد که اثرهای ضد میکروبی نانوذرات فلزی در مقایسه با خود فلزات بسیار بالاتر باشد. آن‌ها می‌توانند پس از ورود به سلول باکتریایی با تداخل در عملکرد پروتئین‌های حاوی سولفور و مولکول‌های دارای فسفر، نظیر DNA کارایی آن‌ها را از

بنابراین از آنتی‌بیوتیک‌های جدیدتر یعنی پنی-سیلین‌های مقاوم به پنی‌سیلیناز (مانند اکساسیلین و متی‌سیلین) استفاده شد (۱۳). بعد از آن نمونه‌های مقاوم به متی‌سیلین که MRSA نامیده می‌شوند گسترش یافتند که به‌طور معمول به بیش‌تر آنتی-بیوتیک‌ها مقاوم هستند و در حال حاضر، سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بسیار فراوان هستند و هم‌چنان در حال گسترش هستند (۱۴) مطالعه‌های قبلی در شهر مشهد نیز نشان می‌دادند که مقاومت در این باکتری روند افزایشی داشته است (۱۵) ولی در سال‌های اخیر این روند سرعت بیش‌تری گرفته است (۱۶). در یک پژوهش گسترده و پنج ساله نشان داده شد که که فراوانی MRSA در سال ۱۹۹۶ تنها ۱/۷٪، در سال ۱۹۹۷ حدود ۵/۵٪، در سال ۱۹۹۸ نیز ۶/۵٪ بوده و این میزان در سال ۱۹۹۹ به بالاترین مقدار خود یعنی حدود ۶/۵٪ رسید (۱۷). افزایش گسترش مقاومت به متی‌سیلین از قبل پیش‌بینی شده بود و مطالعه‌هایی که در سال ۲۰۰۴ در ترکیه انجام شده بود نشان داده بود که این نوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *استافیلوکوکوس اورئوس* به شدت در حال گسترش است (۵). مطالعه ما نشان داده است که اکثریت نمونه‌ای مورد بررسی این مقاومت را کسب کرده اند. فراوان بودن سویه‌های مقاوم به متی-سیلین در ایران، در قبل توسط Jafaree-Sales در

این ژن می‌توانیم به منظور شناسایی مقاومت متی-سیلین در نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده کنیم. هم‌راستا با نتیجه موجود *Asgaree*، با تأکید بر اپیدمیولوژی *MRSA* در ایران از بین ۷۴۶۴ مقاله استخراج شده از پایگاه‌های اطلاعاتی، نشان داد که ۲۶۹۰ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که ۹۵ درصد از سویه‌ها دارای ژن *mecA* بودند البته فراوانی نسبی *MRSA* در مطالعه‌های مختلف بین ۲۰/۴۸٪ در اصفهان تا ۹۰٪ در تهران متغیر بود (۳۹).

در این پژوهش نانوذره نقره برای بررسی اثر ضد میکروبی *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد این انتخاب همسو با مطالعه *Salmani* و همکارانش در سال ۲۰۱۷ بود که بر روی بررسی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در محیط آزمایشگاهی مطالعه کردند و براساس نتایج حاصل از این مطالعه باکتری‌های *اشرشیاکلا* کم‌ترین حساسیت و باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بیش‌ترین حساسیت را نسبت به نانوذرات نقره نشان دادند (۳۵).

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که نانوذره نقره می‌تواند گزینه‌ای باشد برای جلوگیری افزایش شیوع مقاومت در بین سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* لذا می‌تواند یک گزینه مناسب برای درمان عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* در بیمارستان و تغییر رویکرد درمانی باشد. این پیشنهاد در مطالعه *Azadi* و همکارانش در سال ۱۳۹۵ نیز ارائه شده است و آن‌ها ارتباط معنی‌داری بین *MIC* نانوذره نقره در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با منشاء جداسازی نمونه و مقاومت به متی‌سیلین و جنتامایسین را نشان دادند و ایراز کردند که با توجه به پایین بودن *MIC* نانو ذره نقره بر ایزوله‌های مقاوم به متی‌سیلین، امکان استفاده از آن در کنترل *MRSA* در عفونت بیمارستانی می‌تواند مورد توجه بیش‌تری قرار گیرد (۴۰).

سپاسگزاری

بین بیرند (۲۳). در سال‌های اخیر، استفاده از نانوذرات فلزی به‌عنوان ترکیب‌های ضد اکتیوی روند رو به رشدی داشته است. از این میان نانوذرات نقره (۲۴)، اکسیدهای تیتانیوم (۲۵)، روی (۲۶، ۲۷)، مس (۲۸) و آهن (۲۹، ۳۰) به‌دلیل خواص ضدباکتری مناسب، بیش از سایر نانوذرات مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در خصوص اثر ضد میکروبی نانوذرات بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* مطالعه‌های متعددی انجام شده است. *Pishvae* و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که نانوذره اکسید کروم نقش ضد میکروبی روی این باکتری دارد (۳۱). اثر ضد میکروبی نانوذره طلا و مس نیز بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* در سال ۱۳۹۶ توسط *Nadi* و همکارانش نشان داده شد (۳۲). اثر ضد میکروبی نانوذره نیکل بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز توسط *Gahremani* و همکاران در سال ۱۳۹۴ ارائه شده است (۳۳). در مطالعه حاضر زمان تماس نانوذره ۲۴ ساعت و غلظت نانوذره با روش استاندارد محاسبه گردید چرا که مطالعه *Aasadi* و همکاران نشان داد متغیرهای نوع باکتری، زمان تماس و غلظت نانوذرات نقره عوامل مؤثر بر بروز خاصیت ضد میکروبی نانوذرات نقره است (۳۴).

نتیجه پژوهش حاضر نشان داد که این نانوذره می‌تواند اثر ضد میکروبی روی این باکتری ایفا کند و این اثر را با کم کردن بیان ژن *mecA* ایفا می‌کند. اهمیت بیان ژن *mecA* در مقاومت این باکتری نسبت به متی‌سیلین و این‌که این ژن مسؤل مقاومت به متی‌سیلین در این باکتری است در مطالعه‌های متعددی گزارش شده است. *Ramezanzadeh* و همکاران در سال ۲۰۱۵ در کردستان اعلام کردند که می‌توان با روش تکثیر ژن *mecA*، مقاومت باکتری‌ها را شناسایی کرد (۳۶). این تحقیق توسط *Santosaningsih* نیز تأیید شد (۳۷). لذا همان‌طور که کلیبی بیان کرده بود می‌توانیم مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها را بر اساس ژن *mecA* مقاومت آن‌ها شناسایی کنیم (۳۸). این تحقیق نیز با توجه به این‌که تمام نمونه‌های مقاوم به متی‌سیلین حامل ژن *mecA* بوده‌اند بیان می‌کند که از

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه شماره ۱۶۲۲۶۳۸۹۶ احمد رشید برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی سلولی و مولکولی از دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد بود. بدین‌وسیله از سرکار خانم بهاره سرگزی که در تمام مراحل اجرای پایان‌نامه مشاور طرح بوده‌اند، سرکار خانم فائزه غلامی بهار و آقای علی قرایی و تمام کارشناسان محترم آزمایشگاه گروه زیست‌شناسی به خاطر همکاری در تمام مراحل سپاسگزاری می‌گردد.

1. V. M. Corman, J. Lienau, M. Witzenth, [Coronaviruses as the cause of respiratory infections]. *Internist (Berl)* 60, 1136-1145 (2019).
2. Saeed Soleiman-Meigooni. Hospital Outbreak of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *The new England journal of medicine*, august 2013 ,1 vol. 369 no. 5
3. A. R. Fehr, R. Channappanavar, S. Perlman, Middle East Respiratory Syndrome: of a Pathogenic Human Coronavirus. *Annu Rev Med* 68, 387-399 (2017).
4. Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7> (2020).
5. World Health Organization. WHO Statement Regarding Cluster of Pneumonia Cases in Wuhan, China Geneva 2020 [updated 9 January 2020 and 14 January 2020]. Available from: <https://www.who.int/china/news/detail/09-01-2020-who-statement-regarding-cluster-of-pneumonia-cases-in-wuhan-china>.
6. Chinese Center for Disease Control and Prevention. Epidemic update and risk assessment of 2019 Novel Coronavirus 28 January 2020 [cited 29 January 2020]. Available from: <http://www.chinacdc.cn/yrdgz/202001/P020200128523354919292.pdf>
7. Iranian Center for Disease Control and Prevention. Epidemic update and risk assessment of 2019 Novel Coronavirus 28 January 2020. [www. Health.sbmu.ac.ir](http://www.health.sbmu.ac.ir) https://www.who.int/csr/sars/biosafety2003_04_25/en
8. Chen, Y., Liu, Q. & Guo, D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *J. Med. Virol.* <https://doi.org/10.1002/jmv.25681> (2020).
9. Montani JP, Vliet VB. General physiology and pathophysiology of the renin-angiotensin system. *Angiotensin Vol. I: Springer; 2004: 3-29.*
10. Hosseini khalili AR, Thompson J, Kehoe A, Hopkinson NS, et al. Angiotensin-converting enzyme genotype and late respiratory complications of mustard gas exposure. *BMC Pulm Med.* 2008;8(1):15.
11. Crisan D, Carr J. Angiotensin I-converting enzyme: genotype and disease associations. *J of Mol Diagn.* 2000; 2(3): 105.
12. Lu, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8) (2020).
13. Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7> (2020).
14. Zhu, N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2001017> (2020).
15. Xu, X. et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci. China Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1637-5> (2020).

16. Hao Xu. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *International Journal of Oral Science* (2020) 12:8 ; <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>.
17. Hao Zhang et al. The digestive system is a potential route of 2019-nCov infection: a bioinformatics analysis based on single-cell transcriptomes. *bioRxiv preprint* doi: <https://doi.org/10.1101/2020.01.30.927806>.
18. Jiahua He Huanyu Tao, Yumeng Yan, Sheng-You Huang*, Yi Xiao. Molecular mechanism of evolution and human infection with the novel coronavirus (2019-nCoV). *bioRxiv preprint* doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.17.952903>.
19. Huang, C., et al., SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs: viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage. *PLoS Pathog*, 2011. 7(12): p. e1002433.
20. Tanaka, T., et al., Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 facilitates efficient propagation in cells through a specific translational shutoff of host mRNA. *J Virol*, 2012. 86(20): p. 11128-37.
21. Graham, R.L., et al., The nsp2 replicase proteins of murine hepatitis virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus are dispensable for viral replication. *J Virol*, 2005. 79(21): p. 13399-411.
22. Gadlage, M.J., R.L. Graham, and M.R. Denison, Murine coronaviruses encoding nsp2 at different genomic loci have altered replication, protein expression, and localization. *J Virol*, 2008. 82(23): p. 11964-9.
23. Lei, J., Y. Kusov, and R. Hilgenfeld, Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein. *Antiviral Res*, 2018. 149: p. 58-74.
24. Serrano, P., et al., Nuclear magnetic resonance structure of the nucleic acid-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 3. *J Virol*, 2009. 83(24): p. 12998-3008.
25. Beachboard, D.C., J.M. Anderson-Daniels, and M.R. Denison, Mutations across murine hepatitis virus nsp4 alter virus fitness and membrane modifications. *J Virol*, 2015. 89(4): p. 2080-9.
26. Gadlage, M.J., et al., Murine hepatitis virus nonstructural protein 4 regulates virus-induced membrane modifications and replication complex function. *J Virol*, 2010. 84(1): p. 280-90.
27. Stobart, C.C., et al., Chimeric exchange of coronavirus nsp5 proteases (3CLpro) identifies common and divergent regulatory determinants of protease activity. *J Virol*, 2013. 87(23): p. 12611-28.
28. Zhu, X., et al., Porcine Deltacoronavirus nsp5 Antagonizes Type I Interferon Signaling by Cleaving STAT2. *J Virol*, 2017. 91(10).
29. Angelini, M.M., et al., Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *mBio*, 2013. 4(4).
30. Cottam, E.M., M.C. Whelband, and T. Wileman, Coronavirus NSP6 restricts autophagosome expansion. *Autophagy*, 2014. 10(8): p. 1426-41.

31. Kirchdoerfer, R.N. and A.B. Ward, Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors. *Nat Commun*, 2019. 10(1): p. 2342.
32. Zhai, Y., et al., Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7-nsp8 hexadecamer. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. 12(11): p. 980-6.
33. Te Velthuis, A.J., S.H. van den Worm, and E.J. Snijder, The SARS-coronavirus nsp7+nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both de novo initiation and primer extension. *Nucleic Acids Res*, 2012. 40(4): p. 1737-47.
34. Egloff, M.P., et al., The severe acute respiratory syndrome-coronavirus replicative protein nsp9 is a single-stranded RNA-binding subunit unique in the RNA virus world. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(11): p. 3792-6.
35. Zeng, Z., et al., Dimerization of Coronavirus nsp9 with Diverse Modes Enhances Its Nucleic Acid Binding Affinity. *J Virol*, 2018. 92(17).
36. Bouvet, M., et al., Coronavirus Nsp10, a critical co-factor for activation of multiple replicative enzymes. *J Biol Chem*, 2014. 289(37): p. 25783-96.
37. Ma, Y., et al., Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14-nsp10 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. 112(30): p. 9436-41.
38. Fang, S.G., et al., Proteolytic processing of polyproteins 1a and 1ab between non-structural proteins 10 and 11/12 of Coronavirus infectious bronchitis virus is dispensable for viral replication in cultured cells. *Virology*, 2008. 379(2): p. 175-80.
39. Ahn, D.G., et al., Biochemical characterization of a recombinant SARS coronavirus nsp12 RNA-dependent RNA polymerase capable of copying viral RNA templates. *Arch Virol*, 2012. 157(11): p. 2095-104.
40. Te Velthuis, A.J., et al., The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. *Nucleic Acids Res*, 2010. 38(1): p. 203-14.
41. Adedeji, A.O. and H. Lazarus, Biochemical Characterization of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Helicase. *mSphere*, 2016. 1(5).
42. Eckerle, L.D., et al., Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog*, 2010. 6(5): p. e1000896.
43. Jia, Z., et al., Delicate structural coordination of the Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus Nsp13 upon ATP hydrolysis. *Nucleic Acids Res*, 2019. 47(12): p. 6538-6550.
44. Bouvet, M., et al., Viral Disease Research & Therapeutic Development RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(24): p. 9372-7.
45. Minskaia, E., et al., Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(13): p. 5108-13.
46. Bhardwaj, K., et al., RNA recognition and cleavage by the SARS coronavirus endoribonuclease. *J Mol Biol*, 2006. 361(2): p. 243-56.
47. Zhang, L., et al., Structural and Biochemical Characterization of Endoribonuclease Nsp15 Encoded by Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol*, 2018. 92(22).

48. Chen, Y., et al., Biochemical and structural insights into the mechanisms of SARS coronavirus RNA ribose 2'-O-methylation by nsp16/nsp10 protein complex. *PLoS Pathog*, 2011. 7(10): p. e1002294.
49. Decroly, E., et al., Crystal structure and functional analysis of the SARS-coronavirus RNA cap 2'-O-methyltransferase nsp10/nsp16 complex. *PLoS Pathog*, 2011. 7(5): p. e1002059.
50. Shi, P., et al., PEDV nsp16 negatively regulates innate immunity to promote viral proliferation. *Virus Res*.
51. Wong, D. W., Oudit, G. Y., Reich, H., Kassiri, Z., Zhou, J., Liu, Q. C., Scholey, J. W. (2007). Loss of angiotensin-converting enzyme-2 (Ace2 accelerates diabetic kidney injury. *The American Journal of Pathology*, 171(2), 438-451.
52. Zhang, H., Penninger, J. M., Li, Y., Zhong, N., & Slutsky, A. S. (2020). Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Medicine*, DOI: <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05985-9>
53. Fehr A.R., Perlman S. (2015) Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. In: Maier H., Bickerton E., Britton P. (eds) Coronaviruses. *Methods in Molecular Biology*, vol 1282. Humana Press, New York, NY.
54. Cai, G., Cui, X., Zhu, X., & Zhou, J. (2020). A Hint on the COVID-19 Risk: Population Disparities in Gene Expression of Three Receptors of SARS-CoV, Preprints, DOI: doi: 10.20944/preprints202002.0408.v1.
55. Zheng, Y. Y., Ma, Y. T., Zhang, J. Y., & Xie, X., (2020), COVID-19 and the cardiovascular system. *Nature Reviews Cardiology*, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0360-5>.
56. Wang, J., Luo, Q., Chen, R., Chen, T., Li, J., (2020), Susceptibility Analysis of COVID-19 in Smokers Based on ACE2. Preprints, DOI:10.20944/preprints202003.0078.v1
57. Grayson Wick. Coronavirus 2020, What is really happening and how to prevent it. updated February 12 th , 2020.
58. Wenzhong Liu. COVID-19 Disease: ORF8 and surfce glycoprotein inhibit Heme Metabolism by binding to Porphyrin. Scholl of Life Science, Yibin University 644000. liuwz@suse.edu.cn.
59. Diao, K., Han, P., Pang, T., Li, Y. & Yang, Z. HRCT Imaging Features in Representative Imported Cases of 2019 Novel Coronavirus Pneumonia. *Precision Clinical Medicine* (2020).
60. Chang, D. et al. Epidemiologic and clinical characteristics of novel coronavirus infections involving 13 patients outside Wuhan, China. *JAMA* (2020).
61. To Sing Fung and Ding Xiang Liu. Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. *Annual Review of Microbiology*. Annu. Rev. Microbiol. 2019. 73:529–57.
62. Masters PS. 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66:193–292.
63. LuoH,ChenQ,Chen J,Chen K, Shen X, JiangH. 2005. The nucleocapsid protein of SARS coronavirus has a high binding affinity to the human cellular heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1.FEBS Lett.579(12):2623–28.

64. Kristian G. Andersen^{1,2}. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*. www.nature.com/naturemedicine. 17 MARCH 2020. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
65. Zhou, P. et al. *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7> (2020)
66. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020; 395(10223):497- 506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
67. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020; 395(10223):507-513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
68. Fang F, Luo X. Facing a major outbreak of new coronavirus infections in 2019: thoughts of pediatricians [J]. *Chinese Journal of Pediatrics*. 2020; 58(2):81-85. doi: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310. 2020.02.001.
69. Rodriguez-Morales AJ, MacGregor K, Kanagarajah S, Patel D, Schlagenhauf P. Going global - Travel and the 2019 novel coronavirus. *Travel Med Infect Dis*. 2020; 33:101578.
70. Khan S, Ali A, Siddique R, Nabi G. Novel coronavirus is putting the whole world on alert. *J Hosp Infect*. 2020. doi: 10.1016/j.jhin.2020.01.019

