Arch

مجله دانشکده علوم پزشکی نیشابور

www.journalnums.ac.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:18 IRST on Tuesday January 12th 2021

# بررسی اثر آنتی‌باکتریال نانوذرات نقره علیه جدایه های اشرشیاکلی تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف جدا شده از عفونت‌های ادراری

الهه یزدی [۱] تینا دادگر*[۱]، حمیدرضا پردلی[۱]، فاطمه شاکری[۲]

۱-گروه زیست شناسی، واحد گرگان ، دانشگاه آزاد اسلامی ، گرگان، ایران

۲-گروه زیست شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گرگان، گرگان، ایران

مقاله پژوهشی اصیل

**تاریخ دریافت:** ۱۳۹۸/۰۳/۱۲

**تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۰۵/۲۷

***نویسنده مسئول:** تینا دادگر، گرگان بلوار شهید کلانتری خیابان دانشجو مجتمع دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

تلفن: ۰۱۷۳۲۱۵۳۰۰۰

پست الکترونیک:

dadgar_teena@yahoo.com

## چکیده

***مقدمه***

با توجه به رشد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و بررسی راه‌های جدید در نانوبیوتکنولوژی، این مطالعه به بررسی اثر درمانی نانوذرات نقره روی باکتری *E.coli* برای کنترل و یافتن درمان جدید علیه جدایه‌های مولد ESBL اشرشیاکلی می‌پردازد.

***مواد و روش‌ها***

بر روی ۱۰۰ نمونه اشرشیاکلی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش دیسک برای ۳ آنتی‌بیوتیک سفالوسپورین نسل سوم و پس از آن برای جدایه‌های مقاوم تست تاییدی انجام شد. تاثیر نانوذره نقره روی ایزوله‌های ESBL با روش انتشار چاهک و در ادامه MIC و MBC نیز انجام شد. جهت آنالیز و بررسی نتایج، از نرم‌افزار spss16 و در تمامی موارد ۰/ ۰۵ >p معنی‌دار در نظر گرفته شد.

***یافته‌ها***

میزان مقاومت به سفالوسپورین نسل سوم به ترتیب ۴۵٪ ، ۲۰٪ و ۴۴٪ بود، تست تاییدی در حضور کلاونیک اسید نشان داد که ۸۵/۵ درصد نمونه‌ها ESBL می‌باشند و بیشترین اثر مهارکنندگی نانوذره نقره به روش انتشار چاهک در غلظت‌های ppm ۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰ بود. بیشترین MIC به دست آمده متعلق به غلظت ppm ۱۵/۶۲ و کمترین ppm ۷/۸ بود. در تعیین MBC در ایزوله‌ها بیشترین و کمترین غلظت که اثر کشندگی داشت به ترتیب، ppm ۶۲/۵ و ppm ۷/۸ بود.

***نتیجه‌گیری***

حداقل غلظتی از نانوذره نقره برای از بین بردن باکتری اشرشیاکلی ppm ۷/۸ است. بنابراین محلول کلوئیدی نانو ذره نقره فعالیت ضد باکتریایی بسیار خوبی را در غلظت‌های پایین از خود نشان می‌دهد و به عنوان بیوسید مناسب پیشنهاد می‌شود.

***کلیدواژه‌ها***

اشرشیاکلی، نانوذره نقره، آنتی‌باکتریال، عفونت ادراری



www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:18 IRST on Tuesday January 12th 2021

## مقدمه

عفونت ادراری (UTI)[1] عبارت است از ورود، استقرار و آسیب‌زایی یک میکروارگانیزم در دستگاه ادراری که این عفونت توسط باکتری‌های مختلفی ایجاد می‌شود و در تمامی گروه‌های سنی و در هر دو جنس زن و مرد دیده می‌شود. میزان بروز آن در نوزادان دختر و پسر مشابه است و برآورد می‌شود که فراوانی آن در کودکان زیر یک سال کمتر از ۲٪ باشد. البته با افزایش سن میزان ابتلا در زنان بطور معنی‌داری از مردان بیشتر می‌شود (۱، ۲). در این عفونت‌ها، اشرشیاکلی یکی از شایع‌ترین عوامل ایجاد کننده بیماری هستند که در تمامی گروه‌های سنی و نیز تمامی اشکال عفونت ادراری شامل سیستست، پیلونفریت، نواع اکتسابی از بیمارستان و جامعه در تمام دنیا یافت می‌شوند. این باکتری ساکن طبیعی دستگاه گوارش است و می‌تواند خود را به دستگاه ادراری رسانده و در آن عفونت ایجاد نماید (۳، ۴، ۵). جهت درمان عفونت اداری، آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از خانواده بتالاکتام مورد استفاده قرار می‌گیرد که مصرف بی‌رویه آنها سبب افزایش مقاومت در میکروارگانیزم‌ها گشته است. مهمترین این مقاومت‌ها، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز (یک دسته شامل ESBL که توسط پلاسمید کد می‌شود) می‌باشد که به هیدرولیزو غیرفعال شدن آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام منجر می‌شود (۶). با ظهور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، راه‌های دیگری برای درمان پیشنهاد می‌شود که در این میان به نانوذرات در مصارف ضد میکروبی توجه خاصی شده است. از جمله پرکاربردترین نانوذرات پس از نانولوله‌های کربنی، نانوذرات نقره[2] بوده که دارای مصارف متعددی در عرصه پزشکی است (۷، ۸، ۹).

برخی از مهمترین کارکردهای نانوذرات نقره در ارتباط با درمان و سلامت شامل ضدباکتریایی بودن، تسریع فرآیند ترمیم زخم، اجتناب از عفونت زخم و مرگ عامل بیگانه می‌باشد. همچنین از خواص اساسی نانوذرات نقره می‌توان به آبدوست بودن، غیرسمی بودن برای بدن، غیر حساسیت‌زا، پایداری زیاد، سازگاری با محیط زیست، مقاومت در برابر حرارت، عدم ایجاد و افزایش مقاومت و سازگاری در میکروارگانیزم و قابلیت آن‌ها در اضافه شدن به الیاف، پلیمر، سرامیک، سنگ، رنگ و غیره بدون تغییر دادن خواص ماده اشاره نمود.

خاصیت آنتی‌باکتریال نانوذرات نقره باعث گسترش کاربردهای آن در حوزه‌های نساجی، صنایع رنگ، سرامیک، داروسازی، کشاورزی، دامپروری و لوازم آرایشی-بهداشتی شده است. مهمترین مکانیزم نانوذرات نقره حمله به زنجیره تنفسی میکروارگانیزم و تحت تاثیر قرار دادن سایر فرآیندهای سلولی بوده و در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود (۱۰، ۱۱، ۱۲). ویژگی‌های ترکیب مورد استفاده، به ابعاد و شکل نانوذرات نقره بستگی دارد، که این امر مستقیماً تحت تأثیر روش سنتز آن می‌باشد. در این راستا نحوه‌ی فرآوری نانوذرات و نوع آنها تعیین‌کننده‌ی مکانیسم تأثیر آن خواهد بود و در نتیجه هر کاربردی نیازمند مطالعه‌ی دقیق و انتخاب صحیح نوع ترکیب مورد نظر می‌باشد تا نتیجه مطلوب حاصل گردد (۱۳). هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر درمانی نانوذرات نقره روی باکتری *E.coli* برای کنترل و یافتن درمان جدید علیه جدایه‌های مولد ESBL اشرشیاکلی که در برابر دارو مقاومت نشان می‌دهند، می‌باشد.

[1] Urinary tract infection
[2] (Nanosilver) particles


www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:18 IRST on Tuesday January 12th 2021

## مواد و روش‌ها

این پژوهش مطالعه‌ای توصیفی–تحلیلی است که جامعه آماری آن را افراد مبتلا به عفونت ادراری در گروه‌های مختلف سنی مراجعه کننده به بیمارستان و آزمایشگاه تشخیص طبی شهر گرگان، تشکیل می‌دهند. از بین نمونه‌های ادراری مراجعین سرپایی به بیمارستان (صیاد شیرازی) و آزمایشگاه‌ها جمعاً ۱۰۰ نمونه اشرشیاکلی با کلنی کانت بیش از ۱۰۰۰۰۰ (CfU)[1]/ml جداسازی شد. برای هر فرد پرسشنامه‌ای حاوی اطلاعات فردی تنظیم شد. نمونه‌های انتخابی در محیط EMB جمع‌آوری شده و برای تست‌های تعیین مرفولوژی و بیوشیمیایی استفاده شدند. برای تایید نمونه‌ها، بررسی TSI، SIM، MRVP، سیمون سیترات و اوره آگار و تست اکسیداز برای نمونه‌ها انجام شد و ۱۰۰ نمونه اشرشیاکلی، خالص‌سازی و احیا گردید.

**تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار از دیسک و تایید** ESBL

در این تحقیق ۴ دیسک آنتی‌بیوتیکی جهت آنتی‌بیوگرام سویه‌های اشرشیاکلی استفاده شده است که عبارتند از: سفتریاکسون (CTR):۳۰µg، سفوتاکسیم (CTX):۳۰µg، سفتازیدیم (CAZ):۳۰µg، سفوتاکسیم/کلاولانیک اسید (CTX+C):۳۰/۱۰ µg. آنتی‌بیوگرام طبق استانداردهای (CLSI)[2] انجام شد (۱۴). تمامی جدایه‌هایی که به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم مقاومت نشان دادند، به عنوان کاندید ESBL در نظر گرفته شدند و جهت اثبات ESBL بودن با استفاده از روش (DDST)[3] مورد آزمون قرار گرفتند، به این ترتیب که دیسک سفوتاکسیم ۳۰ µg وسفوتاکسیم /کلاولانیک اسید ( CTX: 30µg/CV: 10 ) µgاستفاده شد. در صورتی که هاله عدم رشد دیسک همراه با کلاولانیک ۳۰ µg، حداقل۵ ≥ بیشتر از قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک فاقد کلاولانیک اسید بود، به عنوان ESBL در نظر گرفته شد (۱۵).

**مشخصات و ویژگی‌های نانوذره نقره مورد استفاده**

در این مطالعه از نانوذرات نقره کلوییدی با نام تجاری Nanocid L2000 (شرکت نانو نصب نیرو، ایران) استفاده شده است. این ماده حاوی ۴۰۰۰ppm از نانوذرات نقره است که به صورت محلول معلق کلوییدی استفاده می‌شود. این ماده در محیط کشت پایداری خود را حفظ می‌کند. اندازه این نانوذرات بین ۱۸ تا ۳۴ نانومتر بوده و پتانسیل الکتریکی در تعلیق( زتا ζ ) این ماده برابر ۳۳/۵- اندازه‌گیری شده است که پایداری متوسط این ماده را نشان می‌دهد.

**تعیین** MIC[4] **نانوذره نقره**

در ادامه، اثر نانوذره نقره به روش انتشار چاهک در آگار و میکرو تیتر پلیت تعیین گردید. برای سنجش اثر نانوذرات نقره در جلوگیری از رشد باکتری‌ها بعد از آماده‌سازی کشت ۱۸-۲۰ ساعته در محیط مولر هینتون آگار و فعال‌سازی باکتری، سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک‌فارلند از باکتری در محیط BHI براث تهیه شد و در انکوباتور به مدت ۱ ساعت قرار داده شد تا به کدورت لازم برسد.

سپس سوسپانسیون باکتری را تا کدورت مکفارلند معادل$^{-5}$۱۰رقیق کرده و سوسپانسیونی معادل$^{-5}$ ۱۰×۱/۵تهیه گردید. سپس در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای در ردیف اول در هر چاهک به مقدار۱۰۰µL نانوذره نقره با غلظت‌های مختلف + µL ۱۰۰ محیط BHI براث تلقیح شد. در ردیف دوم تا هشتم از چاهک دوم در هر چاهک مقدار۱۰۰µL نانوذره نقره با غلظت‌های مختلف + ۱۰۰µL از سوسپانسیون میکروبی

[1] Colony-forming unit
[2] Clinical and laboratory standards institute
[3] Double Disk Synergy Test
[4] Minimum Inhibitory Concentration

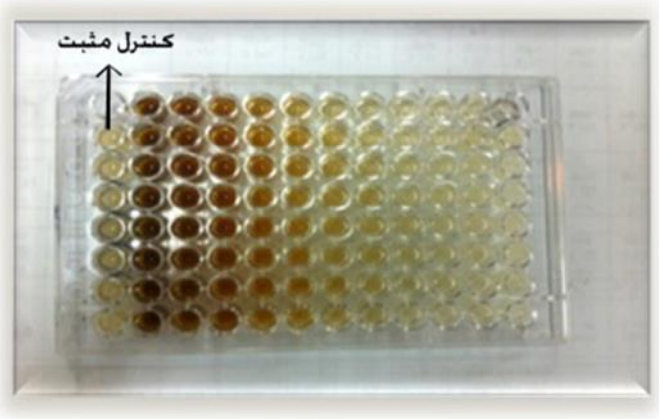


www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:18 IRST on Tuesday January 12th 2021

تلقیح گردید و ستون اول کنترل، مثبت در نظر گرفته شد. مقدار ۱۰۰L μ محیط BHI + ۱۰۰L μ سوسپانسیون میکروبی $10^{-5}$ تلقیح شده و پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون در دما مناسب رشد باکتری مورد نظر کدورت چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر و توسط دستگاه الایزاریدر در طول موج ۵۷۰ خوانده شد. اولین رقتی از نانو نقره که باکتری رشد نکرده بود به عنوان MIC تعیین گردید (شکل ۱).




شکل ۱- تعیین اثر نانو نقره به روش میکروتیتر پلیت

**تعیین MBC نانوذره نقره**

پس از تعیین حداقل غلظتی از نانوذرات نقره که برای باکتری‌ها مهارکننده است، به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی آن در برابر باکتری از چاهک‌های فاقد کدورت که در آنها رشد مهار شده است، با استفاده از لوپ استریل و در کنار شعله یک لوپ از چاهکی که MIC در نظر گرفته شد و ۵ تا چاهک قبل از آن را در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در انکوبانور در دمای ۳۷ºC انکوبه شدند و رشد باکتری‌ها بررسی شدند.

توصیف متغیرهای کمی بوسیله محاسبه شاخص‌های مرکزی و پراکندگی و رسم نمودار انجام شد و متغیرهای کیفی با محاسبه درصد فراوانی انجام گردید و همچنین اطلاعات بدست آمده از نمونه‌ها و نتایج ارزیابی‌ها در نرم‌افزار SPSS16 وارد شد و با روش Chi-Square آنالیز و مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت و در تمامی موارد سطح معنی‌دار $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

**جامعه مورد بررسی**

بررسی بر روی ۱۰۰ایزوله اشرشیاکلی انجام شد، نمونه ها طی ۱ سال، از بیماران غیر بستری مراجعه کننده به آزمایشگاه های تشخیص طبی در شهر گرگان جمع آوری گردید و تمامی ایزوله ها کلنی‌کانت بیش از ۱۰۰/۰۰۰CFU/ml داشتند.

محدوده سنی از ۱۷ سال تا ۷۱ سال متغییر بود و میانگین سنی بیماران ۳۳ سال بود. ۶۲٪ از افراد در گروه سنی جوان (۱۷-۴۵)، ۳۲ ٪ افراد در گروه میان‌سال و ۶ ٪ افراد در گروه سنی مسن قرار داشتند. ۶۴٪ بیماران زن و ۳۶٪ مرد بودند که ۸۰٪ آنها ساکن شهر بودند. شایع‌ترین نشانه‌های بالینی


www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:18 IRST on Tuesday January 12th 2021

در افراد مورد مطالعه سوزش ادرار، تب و تکرر ادرار بوده است. ۷۷٪ تکرر ادرار و ۶۹ ٪ سوزش ادرار داشتند که از بارزترین نشانه‌های بالینی در افراد مورد مطالعه بود و فقط ۸ ٪ از آنها سابقه استفاده از آنتی‌بیوتیک را گزارش نموده بودند.

## حساسیت آنتی بیوتیکی

### فراوانی جدایه‌های مقاوم به سفالوسپورین‌های نسل سوم

مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های نسل سوم نظیر سفتازیدیم و سفتری آکسون بررسی شد که نتایج به‌دست آمده در نمودارهای ۲ و ۳ آمده است و مشخص گردید که ۲۰٪ از کل نمونه‌ها، به سفتازیدیم مقاوم بودند و ۴۴ ٪ از نمونه‌ها به سفتری آکسون مقاوم بودند (در این مطالعه نمونه‌های حدواسط نیز در گروه حساس قرار گرفتند). جهت شناسایی نمونه‌های ESLB در مرحله اول، تست آنتی‌بیوگرام با سفوتاکسیم (سفالوسپورین نسل سوم) انجام شد، از ۱۰۰ مورد آزمون، در ۴۵٪ (۶۸ مورد) مقاومت به سفوتاکسیم مشاهده شد که مشکوک به ESLB بوده و در غربالگری اولیه ESLB قرار گرفتند و پس از آن برای تمام نمونه‌هایی که به سفوتاکسیم مقاوم بودند، تست تاییدی در حضور کلاونیک اسید انجام شد. بر این اساس از ۶۸ نمونه مقاوم به سفوتاکسیم در ۵۸ مورد (۸۵/۵٪) قطر هاله در حضور کلاونیک اسید افزایش نشان داد و ESBL بودن این نمونه‌ها مورد تایید قرار گرفت. بنابراین فراوانی ESBL در ۱۰۰ جدایه اشرشیاکلی یوروپاتوژن بدست آمده از عفونت ادراری در این مطالعه ۵۸٪ می‌باشد.

### تطابقت مقاومت به سفتری آکسون و سفتازیدیم با ESBL

از ۵۷ جدایه اشرشیاکلی مقاوم به سفتازیدیم و ۴۴ جدایه مقاوم به سفتری آکسون به ترتیب ۱۶ (۸۰٪) و ۳۹ (۸۸/۶٪) مورد ESBL بوده‌اند. میزان حساسیت و اختصاصیت سفتری آکسون برای جداسازی ESBL بهتر می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱- فراوانی مقاومت به سفتازیدیم و سفتری آکسون بر مبنای ESBL

| مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل سوم بر مبنای ESBL | سفتازیدیم | | سفتری آکسون | |
|---|---|---|---|---|
| | مقاوم | حساس | مقاوم | حساس |
| ESBL | ۱۶ (۸۰ ٪) | ۴۲ (۵۲/۵ ٪) | ۳۹ (۸۸/۶ ٪) | ۱۹ (۳۳/۹ ٪) |
| Non ESBL | ۴۱ (۲۰ ٪) | ۳۸ (۴۷/۵ ٪) | ۵ (۱۱/۴ ٪) | ۳۷ (۶۶/۱ ٪) |

### فراوانی ESBL در اشرشیاکلی و ویژگی بیماران مبتلابه آن

نمونه‌های ESBL از نظر متغیرهای عوامل دموگرافیک نظیر (جنسیت، محل زندگی) و عوامل بالینی نظیر (سوزش ادرار، تکرر ادرار، سابقه استفاده از آنتی‌بیوتیک) بررسی شد که در جدول‌های (۲ و ۳) آورده شده است. در تمامی موارد سطح معنی‌دار P < ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.



www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:18 IRST on Tuesday January 12th 2021

جدول ۲- توزیع فراوانی عوامل دموگرافیک در جدایه‌های اشرشیاکلی ESBL و Non ESBL

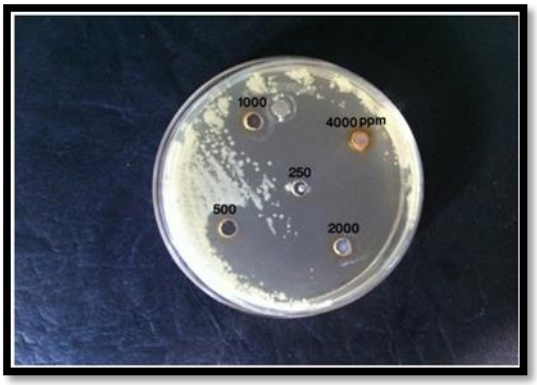
| عوامل درموگرافیک | متغیر | ESBL | Non ESBL | *P value |
|---|---|---|---|---|
| محل زندگی | شهر | ۴۶ (٪۷۹/۳) | ۳۴ (٪ ۸۱) | ۰/۸ |
| | روستا | ۱۲ (٪۲۰/۷) | ۸ (٪ ۱۹) | |
| جنسیت | مرد | ۹ (٪۱۵/۵) | ۲۷ (٪ ۶۴/۳) | ۰/۷ |
| | ز ن | ۴۹ (٪۸۴/۵) | ۱۵ (٪ ۳۵/۷) | |

جدول ۳- فراوانی علائم بالینی در بیماران مبتلا به عفونت ادراری ناشی از اشرشیاکلی در دو گروه ESBL , Non ESBL

| علایم بالینی | ESBL | | Non ESBL | | *P Value |
|---|---|---|---|---|---|
| | دارد | ندارد | دارد | ندارد | |
| سوزش ادرار | ۴۶ (٪ ۷۹/۳) | ۱۲ (٪ ۲۰/۷ ) | ۲۳ (٪ ۵۴/۸ ) | ۱۹ (٪ ۴۵/۲ ) | ۱/۰ |
| تکرر ادرار | ۵۰ (٪ ۸۶/۲) | ۸ (٪ ۱۳/۸) | ۲۷ (٪ ۶۴/۳) | ۱۵ (٪ ۳۵/۷ ) | ۰/۶ |
| سابقه استفاده از آنتی‌بیوتیک | ۷ (٪ ۱۲/۱ ) | ۵۱ (٪ ۸۷/۹) | ۱ (٪ ۲/۴ ) | ۱۰ (٪ ۷۹/۶) | ۰/۲ |

### تعیین اثر نانوذره نقره به روش چاهک

پس از تعیین جدایه‌های ESBL با استفاده از روش دیسک فیوژن و تست تاییدی با استفاده از روش DDT کلیه نمونه‌ها ESBL و Non ESBL تحت تاثیر غلظت‌های ppm ۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ نانوذره نقره به روش چاهک قرار گرفتند و قطر هاله عدم رشد در آنها اندازه‌گیری شد (شکل ۲). در میانگین به دست آمده از غلظت‌های مختلف بیشترین اثر مهارکنندگی در بین غلظت‌های مورد مطالعه به ترتیب در غلظت‌های ppm ۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰ بود و در غلظت ppm ۵۰۰ و ۲۵۰ اثر مهارکنندگی نزدیک به هم و کمتری داشتند، بنابراین اثر آنتی‌باکتریال نانوذره نقره وابسته به غلظت می‌باشد.





www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۹- اثر نانوذره نقره به روش انتشار چاهک

**تعیین MIC و Sub MIC نانوذره نقره روش میکروتیترپلیت**

در بررسی MIC نانو ذره نقره کمترین غلظت ممانعت کنندگی در رشد MIC معادل ۷/۸ ppm می‌باشد و بیشترین غلظت معادل ۳۱/۵۲ ppm بوده است. ب

یشترین فراوانی MIC به ترتیب در غلظت‌های ۱۵/۶ ppm، ۷/۸ ppm، ۳۱/۲۵ ppm نانوذره نقره در نظر گرفته شد. در غلظت ۱۵/۶ ppm که بیشترین فراوانی را در بین غلظت‌های MIC مشاهده شد، ۶۵/۲٪ نمونه‌ها دارای MBC برابر با MIC بودند و کمترین غلظت ممانعت کنندگی از رشد باکتری غلظت ۷/۸ ppm بود که ۵۰٪ نمونه‌ها در این غلظت دارای MIC برابر با MBC بودند و همچنین بیشترین فراوانی MBC در غلظت‌های ۱۵/۶ ppm، ۳۱/۲۵ ppm، ۶۲/۵ ppm، ۷/۸ ppm بود و کمترین غلظت موثر MBC معادل ۷/۸ ppm می‌باشد.

**نتایج سنجش MIC در جدایه‌های ESBL و Non ESBL**

در نمونه‌های ESBL و Non ESBL غلظت ۳۱/۲۵ ppm، بیشترین اثر مهاری را داشت (غلظتی که موثر بوده) و کمترین غلظت موثر MIC به دست آمده ۷/۸ ppm می‌باشد. فراوان‌ترین MIC به دست آمده در این نمونه‌ها متعلق به غلظت ۱۵/۶۲ ppm به ترتیب ۷۰/۷ ٪ و ۷۳/۸٪ بوده است (جدول ۴).

جدول ۴- درصد فراوانی غلظت MIC نانوذره نقره علیه جدایه‌های ESBL و Non ESBL اشرشیاکلی

| غلظت MIC نانو ذره نقره (ppm) / جدایه اشرشیا کلی | ۷/۸ | ۱۵/۶۲ | ۳۱/۲۵ | تعداد کل |
|---|---|---|---|---|
| ESBL | ۱۳ ( ٪ ۲۲/۴ ) | ۴۱ ( ٪ ۷۰/۷ ) | ۴ ( ٪ ۶/۹ ) | ۵۸ |
| Non ESBL | ۹ (٪ ۲۱/۴) | ۳۱ ( ٪ ۷۳/۸ ) | ۲ ( ٪ ۴/۸ ) | ۴۲ |
| تعداد کل | ۲۲ (٪۲۲ ) | ۷۲ ( ٪ ۷۲ ) | ۶ ( ٪۶ ) | ۱۰۰ |

نتایج مطالعه نشان داد که در بررسی قدرت مهارکنندگی نانوذره نقره بر جدایه‌های ESBL و Non ESBL اشرشیاکلی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. p> ۰/۰۵ به دست آمد.

**تعیین قدرت کشندگی (MBC) نانوذره نقره در جدایه‌های ESBL و Non ESBL**

در تعیین قدرت کشندگی نانوذره نقره در جدایه‌های ESBL و Non ESBL، نتایج بدست آمده بیانگر آن است که بیشترین فراوانی قدرت کشندگی نانوذره نقره در ESBL و Non ESBL ها متعلق به غلظت ۱۵/۶۲ ppm بوده و بیشترین غلظت که اثر کشندگی دارد در جدایه‌های ESBL و Non ESBL، ۶۲/۵ppm و کمترین غلظت ۷/۸ppm بود. در قدرت کشندگی نانو نقره بر روی جدایه‌های ESBL و Non ESBL اختلاف معنی‌داری مشاهده شد جدول (۵) (P< ۰/۰۵).


www.SID.ir
Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:18 IRST on Tuesday January 12th 2021

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:18 IRST on Tuesday January 12th 2021

جدول ۵- درصد فراوانی غلظت MBC نانوذره نقره علیه جدایه‌های ESBL و NonESBL اشرشیاکلی

| نانوذره نقره MBC غلظت (ppm) / جدایه اشرشیا کلی | ۷/۸ | ۱۵/۶۲ | ۳۱/۲۵ | ۶۲/۵ | تعداد کل | Pvolue |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ESBL | ۷ (۱۲٪/۱) | ۳۱ (۵۳٪/۴) | ۱۳ (۲۲٪/۴) | ۷ (۱۲٪/۱) | ۵۸ | ۰/۰۸ |
| Non esbl | ۴ (۹٪/۵) | ۲۸ (۶۶٪/۷) | ۲ (۴٪/۸) | ۸ (۱۹٪) | ۴۲ | |
| تعداد کل | ۱۱ (۱۱٪) | ۵۹ (۵۹٪) | ۱۵ (۱۵٪) | ۱۵ (۱۵٪) | ۱۰۰ | |

## بحث

عفونت‌های ادراری، عفونت‌های شایعی هستند و مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در این بیماری رو به افزایش است. معمول‌ترین داروهای آنتی‌باکتریال که در درمان UTI استفاده می‌شود؛ کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید، کینولون‌ها و سفالوسپورین‌ها می‌باشد(۱۶). آنتی‌بیوتیک‌های بتا لاکتام که بهترین گزینه برای درمان بسیاری از باکتری‌ها می‌باشند، به دلیل قدرت سمیت پایین و عوارض جانبی کمتر برای سلول‌های یوکاریوتی، طیف اثر گسترده و اثر ضدمیکروبی قوی، به عنوان داروهای انتخابی جهت درمان عفونت‌های ادراری به کار می‌روند و از زمانی که بشر برای درمان عفونت‌های باکتریایی به استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها روی آورده است مقاومت به درمان در باکتری‌ها مشاهده می‌شود. به طوری که روند این مقاومت در دهه‌های اخیر شتاب بیشتری گرفته است که در بین انواع مقاومت‌های تولید شده به وسیله باکتری‌ها، انواعی که توانایی تولیدآنزیم بتالاکتاماز موثر علیه سفالوسپورین‌های نسل سوم را دارند، به این گروه باکتری‌های مولد ESBLs گفته می‌شود.

نتایج این مطالعه نشان داد که در ۶۸ مورد از اشرشیاکلی‌های مورد بررسی مقاومت به سفوتاکسیم وجود دارد و در تست تاییدی مشخص شد که از این تعداد ۵۸ جدایه ESBL بودند. بنابراین فراوانی موارد ESBL در کل نمونه‌ها ۵۸٪ تعیین گردید. مطالعات مختلفی در نقاط مختلف جهان و کشور ما در این خصوص انجام شده و آمارهای متفاوتی از مقاومت از نوع ESBL گزارش شده است. میزان ESBL در اشرشیاکلی‌های شهر گرگان در این بررسی ۵۸٪ به دست آمد که در محدوده آمار شهرهای ایران است، این آمار در شهرهای ایران متفاوت گزارش شده است کمترین آمار مربوط به بیماران بستری و سرپایی شهر رفسنجان، خرم‌آباد و سنندج است که به ترتیب، ۱۰/۲٪، ۱۱٪/۵ و ۱۴/۵٪ از اشرشیاکلی‌هاESBL بودند و بالاترین آمار مربوط به نمونه‌های تهیه شده از بیماران شهر کرمان، تهران و بخش ICU بیمارستان‌های آموزشی تهران است که به ترتیب ۶۸٪، ۶۴/۸٪ و ۶۰/۶٪ می‌باشد.

بروز مقاومت دارویی ESBLs در کشورهای در حال توسعه مثل آفریقا، کشورهای آسیایی مثل عربستان سعودی، ترکیه و ایران، معمولا بیش از ۴۰٪ گزارش می‌شود در حالی که این رقم در کشورهای توسعه یافته پایین‌تر و حدود ۰٪ می‌باشد (۱۷). بر این اساس در ایران طی سالیان اخیر مطالعات گسترده‌ای در این زمینه انجام شده است، کمترین فراوانی مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل سوم مثل سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفتری آکسون در مطالعات


www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:18 IRST on Tuesday January 12th 2021

شاه‌چراغی در شهر تهران در سال ۱۳۸۶، ۲۶٪ و بیشترین میزان در سال ۱۳۸۷ در شهر تبریز ۸۰/۴۹٪ گزارش شده است (۱۸، ۱۹). در مطالعه حاضر ۴۵٪ جدایه‌های اشرشیاکلی به سفوتاکسیم مقاوم بودند و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم و سفتری آکسون به ترتیب ۲۰٪و ۴۴٪ تعیین گردید.

نتایج در MIC نشان می‌دهد که تاثیر غلظت‌های MIC نانوذره نقره در جدایه‌های ESBL و Non ESB اشرشیاکلی اختلاف معناداری با هم نداشته است که مطابق نتایج سایر محققین می‌باشد. به طوریکه Humberto و همکاران در سال ۲۰۱۰ اذعان داشتند، پروتئین‌های مقاوم در برابر دارو که باکتری‌ها را قادر می‌سازند تا از آنتی‌بیوتیک‌ها اجتناب و دوری کنند، بر کارآرایی نقره هیچ تأثیری ندارد (۲۰). از طرف دیگر، Mohamudha و همکاران در تحقیق خود تأثیرات مهاری نانوذرات نقره را به قطر یون‌های نقره نسبت داده و بیان کردند یون‌های نقره به دلیل اندازه کوچک، سطح تماس بیشتری با فضای بیرونی داشته و تأثیر بیشتری نیز بر غشای سلول‌ها می‌گذارند. همچنین نتایج نشان می‌دهد که MIC نانو ذره نقره بر سایر متغیرهای مورد بررسی مثل جنسیت افراد (زن یا مرد) و علایم بالینی (مانند سوزش ادرار و تکرر ادرار) تفاوتی ندارند و این عوامل نمی‌تواند سطح MIC نانوذره نقره را تغییر دهد (۲۱). در این مطالعه ما فراوانی بعضی از ریسک فاکتورها با استفاده از مقایسه فراوانی متغیر در افرادی که با جدایه ESBL و انواع غیر ESBL مبتلا بودند مورد بررسی قرار دادیم. یافته‌های ما نشان داد که ESBL شدن با سن، جنس، محل سکونت در شهر و روستا ارتباطی ندارد. همچنین هیچ یک از علایم بالینی مانند سوزش ادرار، تکرر ادرار، تفاوتی بین دو گروه نشان نداد که این یافته‌ها با تحقیقات شایانفر و همکاران مطابقت دارد.

بنابراین با توجه به این سویه‌های مقاوم استفاده از روش‌های نوین درمانی مانند نانو تکنولوژی ضروری به نظر می‌رسد. گسترش علم نانو تکنولوژی در دهه گذشته، فرصت‌هایی برای کشف تأثیرات ضد باکتریایی نانو ذرات فلزی را ایجاد کرده است. محققان معتقند که نانوذرات فلزی علاوه بر اثر مهاری ذره، به دلیل اندازه کوچک، نسبت سطح به حجم زیادی که دارند و باعث تماس بیشتر با فضای بیرون می‌شوند، تاثیرات ضد باکتریایی زیادی دارند. بنابراین بر عهده مسئولین بهداشتی و مسئولین کارشناس میکروبی منطقه می‌باشد که با نظارت دایمی بر باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به خصوص سویه‌های ESBL فراوانی آنها را تحت کنترل داشته باشند و با توجه به نتایج این مطالعه و تاثیر بسیار خوب نانوذره نقره بر جدایه‌های یوروپاتوژن اشرشیاکلی بطوریکه حداقل غلظتی از نانوذره نقره که توانست از رشد بعضی جدایه‌های اشرشیاکلی ممانعت نماید، غلظت ۷/۸ ppm بود در حالیکه میانگین MIC به‌دست آمده ۱۴/۸۳ و بین سایر متغییرها و غلظت نانوذره نقره تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین نتایج نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری در غلظت MIC نانو ذره نقره بر جدایه‌های ESBL وNon ESBL وجود ندارد. اما در غلظت‌های MBC یعنی اثر کشندگی نانوذره نقره بر جدایه‌های ESBL و Non ESBL دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشد. لذا پیشنهاد می‌شود کارایی نانو نقره در درمان و یا پیشگیری از عفونت‌های حاصله از اشریشیاکلی یوروپاتوژن استفاده کرد.

## نتیجه‌گیری

حداقل غلظتی از نانو نقره که از رشد اشرشیاکلی ممانعت می‌کند، غلظت ۷/۸ ppm است. بنابراین محلول کلوئیدی نانوذره نقره فعالیت ضدباکتریایی بسیار خوبی را در غلظت‌های پایین از خود نشان می‌دهد. با توجه به یافته‌های


www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:18 IRST on Tuesday January 12th 2021

حاصل از ایـن تحقیـق می‌تـوان نتیجـه گرفـت کـه کـاربرد نانوذرات نقره در شرایط invitro در مقادیر کم از رشد باسیل گرم منفی ESBL جلوگیری می‌کند.

## تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامـه کارشناسـی ارشـد در رشـته میکروبیولوژی می باشد. لازم میدانیم از همه عزیزانی که در مراحل مختلف انجا م این پژوهش ما را یاری نموده اند، تشکر و قدردانی نماییم.

## تعارض منافع

در انجام مطالعه حاضر نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی نداشته‌اند.

## References

1. Franiczek R, Ddolna I, Krzyzanowska B, Szufarowski K, kowalska-krochmal B. Conjugative Transfer of Multiresistance Plasmids from ESBL positive Escherichia coli and Klebsiella spp. Clinical Isolates to Escherichia coli Strain K12 C600. Adv Clin Exp Med. 2007; 16(2): 239-247.
2. Takenaka S, Karg E, Roth C, Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann U, et al. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. Environ Health Perspect. 2001; 109(4):547-551.
3. Ali AS, Townes CL, Hall J, Picard RS. Maintaining a sterile urinary tract: the role of antimicrobial peptides. J Urol. 2009; 182(1):21-28.
4. Jasmine B, Lee L, Guy H. Neild. Obstruction and infection Urinary tract infection. Medicine. 2007; 35(8): 423-428.
5. Jawets E, Melnick GL, Adelbereg EA. In: medical microbiology.25th edition, Appleton @Longe,CA. USA.2010;15:265-282.
6. Guilfoile P. 2006. Antibiotic resistant bacteria. Northborough (MA): Chelsea House Publishers; 2006; 22-100.
7. Zhou W, Ma Y, Yang H, Ding Y, Luo X. A label-free biosensor based on silver nanoparticles array for clinical detection of serum p53 in head and neck squamous cell carcinoma. Int. J. Naomedicine. 2011; 6: 381-386.
8. Bhattacharjee A, Ranjan Sen M, Anupurba Sh, Prakash P, Nath G. Detevtion of OXA-2 group extended-spectrumb-lactamase- producing clinical isolates of Escherichia coli from India. J. Antimicrob Chemother. 2007; 60(3):703-704
9. Kreyling WG, Semmler M, Chaudhry Q. A complementary definition of nanomaterial. Nano Today. 2010; 5(3): 165-168.
10. Lee KJ, Dnallathamby P, XU XN. In Vivo Imaging of Transport and Biocompatibility of Single Silver Nanoparticles in Early Development of Zebrafish Embryos. ACS Nano, 2007; (2): 133-143.
11. Shahverdi R, Fakhimi A, Shahverdi HR. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli.* Nanomed: Nanotechnol. 2007; (3): 168–171.
12. Lagarón JM, Cabedo L, Cava D, Feijoo JL, Gavara R, Gimenez E. Improving packaged food quality and safety. Part 2: nanocomposites. Food Addit Contam. 2005; 22(10): 994-998.
13. Bali EB, Acik L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum beta-lactamase produced by Escherichia coli, Acinobacter baumannii beta – lactamase produced by Escherichia coli, Acinobacter baumannii and Klebsiella isolates in a Turkish hospital. Afr J Microbiol Res. 2010; 4(8): 650-654.
14. Clinicaland Laboratory Standards Institute. Performance stan-dards for antimicrobial susceptibility testing; 25th informational supple-ment. CLSI document M100-S25. Clinical and Laboratory Standards In-stitute, Wayne, PA, 2015.


www.SID.ir

Archive of SID


15. Shayanfar N, Rezaei M, Ahmadi M, Ehsanipour F. Evaluation of extended spectrum beta lactamase (ESBL) positive strains of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in bacterial cultures. Iran. J. Pathol. 2010; 5(1): 34-39.
16. Barbosa- Cesnik C, Brown MB , Buxton M, Zhang L, DeBusscher J , Foxman B . Cranberry juice fails to prevent recurrent urinary tract infection: results from a randomized placebo-controlled trial. Clin Infect Dis. 2011; 52(1): 23-30.
17. Theivasanthi T, Algar M. Anti-Bacterial Studies of Silver Nanoparticles.arXiv2011, arXiv:1101.0348.
18. Todar, K. "Pathogenic E. coli". Online Textbook of Bacteriology. University of Wisconsin–Madison Department of Bacteriology. http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli.html. Retrieved 2007-11-30.
19. Mirsalehian A, Akbari- Nakhjavani F, Peymani A, Kazemi B, Jabal Ameli F, Mirafshar SM. Prevalence of Extended Spectrum β-Lactamase- Producing Enterobacteriaceae by Phenotypic and Genotypic and Genotypic Methods in Intensive Care Units in Tehran, Iran. DARU. 2008; 16(3):169-173.
20. Behrooozi A, Rahbar M, Yousefi J V. Frequency of extended spectrum beta -lactamase (ESBLs) producing Escherichia coli and klebseilla pneumonia isolated from urine an Iranian 1000-bed tertiary care hospital. Afr J Microbiol Res. 2010; 4(9): 881-884
21. Parveen RM, Acharya NS, Dhodapkar R, Harish BN, Parija SC. Molecular epidemiology of Multidrug resistant Extended-Spectrum β-Lactamase Producing Klebsiellapneumoniae outbreak in a neonatal intensive care unit. Int J Collab Res Intern Med Public Health. 2010; (2):226–33.

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:18 IRST on Tuesday January 12th 2021


www.SID.ir

Archiv

Journal of Neyshabur University of Medical Sciences

www.journalnums.ac.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 12:18 IRST on Tuesday January 12th 2021

# Evaluation of antibacterial effect of silver nanoparticles against Escherichia coli isolates producing broad-spectrum beta-lactamases isolated from urinary tract infections

**Elahe Yazdi[1], Teena Dadgar[1*], HamidReza Pordeli[1], Fatemeh Shakeri[2]**

1- Department of biology, Gorgan branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran.
2- Department of Microbiology, Gorgan university of Medical science, Gorgan, Iran.

## Original Article

**Received:** 2 Jun 2019
**Accepted:** 17 Aug 2020

***Corresponding Author:**
Teena Dadgar, Gorgan branch, Islamic Azad University, Gorgan, Golestan province, Iran.
**TEL:** 0 17 3215 3000
**Email:**
dadgar_teena@yahoo.com

## ABSTRACT

***Introduction***
Considering the growth of antibiotic resistance and the study of new ways in Nanobiotechnology, this study examines the therapeutic effect of silver nanoparticles on *E.coli* bacteria to control and find new treatments against ESBL isolates of Escherichia coli.

***Materials and Methods***
For 100 samples of Escherichia coli, antibiotic resistance was determined by disc method for 3rd generation cephalosporin antibiotics and then for DDT confirmatory isolates. The effect of silver nanoparticles on ESBL isolates by well diffusion method and further on MIC and MBC was also done. SPSS software was used to analyze and evaluate the results and in all cases $p < 0.05$ was considered significant

***Results***
The rate of resistance to 3 antibiotics of the third generation cephalosporin in this study was 45%, 20%, and 44%, respectively. A confirmation test in the presence of Clavulanic acid showed that 85.5% of the samples were an ESBL and the most inhibitory effect of silver nanoparticles was obtained by diffusion method at concentrations of 4000 ppm, 2000, 1000. The highest MIC values belonged to the concentration of 15.62 ppm and the lowest MIC concentration was 7.8 ppm. In determining MBC in isolates, the highest and lowest concentrations with a fatal effect were 62.5 ppm and 7.8 ppm, respectively.

***Conclusion***
The minimum concentration of nanosilver is 7.8 ppm and MBC obtained to eliminate *E.coli* 7.8 ppm. Therefore, the colloid silver nanoparticle solution exhibits an excellent antibacterial activity at low concentrations

***Keywords***
Escherichia coli, silver Nanoparticles, antibacterial, urinary tract infections, ESBL

► ***Please cite this article as:*** Yazdi E, Dadgar T, Pordeli HR, Shakeri F. Evaluation of antibacterial effect of silver nanoparticles against Escherichia coli isolates producing broad-spectrum beta-lactamases isolated from urinary tract infections. J Neyshabur Univ Med Sci. 2020;8(4):112-123.



www.SID.ir