

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

Ehsan Al-Sabrawi¹, Farahnaz Molavi²

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

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

Abstract

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

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

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

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

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

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

Correspondence to: Farahnaz Molavi

Tel: +98 9155116504

E-mail: Farahmolavi@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-2491-8348

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

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

احسان الصعبراوى^۱، فرحناز مولوی^۲

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

چکیده

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

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

یافته‌ها: مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک و نکومایسین ۵۰٪، سپیروفلوکسازسین ۳۲٪، کلامفنیکل ۱۵٪، تیکوپلانین ۵٪، اریترومایسین ۴۳٪، آمیکاسین ۷۹٪، تتراسایکلین ۱۰٪، سفالکسین ۱۰٪، پنی سیلین ۸۵٪، و لینوزولید ۱٪ بود. ارزیابی مولکولی نشان دهنده حضور ژن *vanA* در تمام سویه های دارای مقاومت چند دارویی بود. بررسی ریل تایم بر روی سویه های مقاومی که وجود ژن *vanA* آنها توسط *PCR* به تایید رسیده و تحت تیمار نانوذرات نقره قرار گرفته بود نشان داد که تأثیر نانوذرات نقره بر روی بیان ژن *vanA* معنی دار و کاهنده است.

نتیجه گیری: مشاهده ۱۷ درصد مقاومت چند دارویی از ۶۴ سویه تایید شده نشان دهنده این است که مسئله مقاومت چند دارویی یک هشدار جدی در استفاده از آنتی بیوتیک ها برای درمان عفونت های ناشی از انتروکوکوس فکالیس است.

وازگان کلیدی: استریتوکوک، نکومایسین، نانوذرات فلزی، مقاوم به چند دارو، زنجیل.

مقدمه
آنواع آنتی بیوتیک هایی که در انتروکوکوس فکالیس مقاومت ایجاد کرده اند، مقاومت به و نکومایسین بسیار شایع و فراوان است (۳). این مقاومت به واسطه مجموعه ژن های *van* حاصل می شود که در بین مجموعه ژن های گروه *vanA* می شود که در بین فرآونی و اهمیت را در این مقاومت دارد (۴). با توجه به اینکه هر ساله هزینه گرافی باست کنترل عفونت های ناشی از این باکتری پرداخت می شود و همچنین با توجه به اینکه انتروکوکوس فکالیس به صورت ذاتی و اکتسابی به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها مقاوم شده اند می توان از مواد ضد باکتریایی دیگری همانند نانوذرات استفاده کرد و آنها را به

آدرس نویسنده مسئول: مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، فرحناز
مولوی (email: Farahmolavi@gmail.com)
ORCID ID: 0000-0002-2491-8348

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۳/۹
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۶/۷

از محلول نیترات نقره ۱ میلی مولار مخلوط گردید. بعد از تغییر رنگ، محلول در میکروتیوب های ۲ میلی لیتری ریخته شده و با دور ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی خارج شده و ۲ میلی لیتر آب دیونیزه یا آب مقطر به رسوب اضافه شد و سانتریفیوژ تکرار شد این مرحله ۳ بار دیگر تکرار گردید و در انتهای رسوب نهایی در پلیت های جداگانه ریخته شد و در محل تاریک گذاشته شد تا خشک گردد و پودر نانوذره آماده گردد (۷).

برای بررسی خصوصیت فیزیکی نانوذره به دست امده از روش های عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری (دانشگاه فردوسی مشهد)، FTIR (Bruker Tensor) (spectroscopy مشهد) و دستگاه طیف سنج پراش پرتو ایکس (X-Ray Explorer GNR) (Diffraction استفاده شد.

تست حساسیت آنتی بیوتیکی

بعد از شناسایی نمونه ها میزان حساسیت نمونه ها به آنتی بیوتیک های رایج و پرمصرف آزمایش شد تا نمونه های مقاوم برای ادامه بژووهش جدا شوند آنتی بیوگرام سویه های به دست آمده با استفاده از روش انتشار از دیسک (کربی بائز) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، از باکتری های رشد کرده سوسپانسیونی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید (۸) و بر روی محیط مولر هینتون آگار به صورت کشت سفره ای کشت داده شد. پلیت ها به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند تا باکتری ها با شرایط جدید سازگاری یابند. پس از آن دیسک های آنتی بیوتیک و نکومایسین (۳۰ µg)، سیپروفلوکساسین (۳۰ µg)، کلامفینیکل (۳۰ µg)، تیکوپلائین (۳۰ µg)، اریترومایسین (۱۵ µg)، آمیکاسین (۳۰ µg)، تتراسیکلین (۳۰ µg)، پنی سیلین (۱۰ µg)، لیزوزولید (۰ ۳ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg) روی محیط قرار گرفت به طوری که فاصله دیسک ها از لپه پلیت ۱/۵ سانتیمتر و نسبت به هم ۲/۵ سانتی متر بود. سپس پلیت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از این مدت اطراف دیسک ها از لحاظ هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفتند قطر ناحیه اطراف دیسک توسط خط کش مخصوص (Antibiotic Zone Scale ruler) اندازه گیری و با مراجعت به جداول کمیته ملی معیارهای آزمایشگاهی بالینی (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)) حساسیت یا مقاومت باکتری به آنتی بیوتیک های رایج تعیین گردید (۸). در نهایت پس از ۲۴ ساعت انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد حداقل غلظت

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

مواد و روشها

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

تایید هویت سویه های جمع آوری شده

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

ساخت نانوذره نقره

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

تأثیر نانوذرات نقره سنتز شده با زنجیل

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

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

| نمای Anneling | نمای توالی پرایمر(۵ پریم به ۳ پریم) | vanA |
|------------------|--|---------|
| ۵۹ | F: GGCTCATCCTCGGTGAA R: GTCCACCTCGCCAACAACCA | |
| ۵۹ | F: CCCAACCCCTTCCTTACTTGC R: CATCAACTTCACCTCACGC | 16S RNA |

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

آشکار سازی محصولات PCR با تکنیک الکتروفوروز ژل آگاراز

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

یافته‌ها

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

بازدارندگی رشد (MIC) (Minimum Inhibitory Concentration) تعیین شد. در تمام این مطالعه از سویه ATCC ۱۵۱۵۵ به عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده شده است.

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

استخراج RNA

استخراج RNA طبق روش کار کیت مخصوص (۵۲۹۲) شرکت پارس طوس زیست فناور و پس از تیمار دهی سوسپانسیون باکتریایی واحد ژن *vanA* با نانوذره نقره (رقت بعد از حداقل غلظت بازدارندگی رشد) انجام شد. برای اطمینان از صحت استخراج نمونه، ارزیابی کمی از طریق روش جذب نوری سپس نمونه های استخراج شده مورد بررسی اسپکتروفوتومتری قرار گرفت. سپس نسبت OD260 به OD280 را بررسی کرده و در صورت جذب نوری بین ۲۲۰/۲۶۰ تا ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر با دستگاه نانودرایپ انجام شد (۱۰).

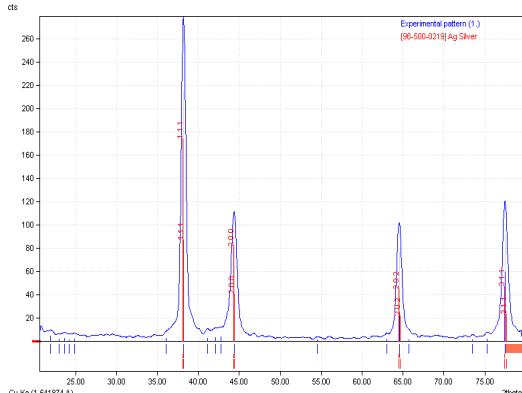
سنتز Complementary DNA

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

PCR و الکتروفوروز (polymerase chain reaction)

پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش با نرم فزار الیگو طراحی شدند و برای سنتز به شرکت سیناکلون ایران سفارش داده شدند (جدول ۱). واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵/۵ میکرولیتر PCR master mix 5X (ایران، سیناکلون) دارای ۰/۰۵ U/ μ l Taq DNA polymerase، ۰/۰۵ mM dNTPs، ۰/۴ mM MgCl₂، ۳ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۰/۸ میکرومولر، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۱۰/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل با استفاده از گریدیانت ترموسایکلر (پن دورف، آلمان) و با برنامه دمایی، دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه برای ۳۴ سیکل در شرایط ؛ واسرثت شدن (Denaturation) ۵۸ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر (Annealing) درجه برای ۳۰ ثانیه، طویل شدن (Extension) ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه

همچنین نتایج پراش اشعه ایکس (XRD) با طول موج ۱,۵۵ \AA نشان داد که اکثر نانوذرات شکل مکعبی داشتند و پیک جذبی در آنها تشخیص داده شد (شکل ۳).

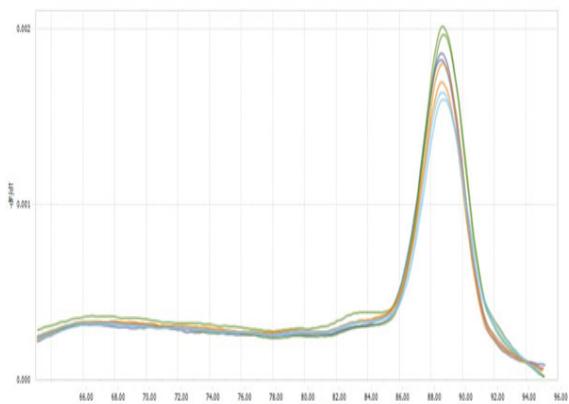


شکل ۳. الگوی پراش اشعه ایکس بر نانوذره نقره ساخته شده در پژوهش. محور افقی نشان دهنده زاویه بین پرتو تابش و بازتابش و محور عمودی نشان دهنده شدت پرتوی ایکس بازتابیده است.

نتایج آزمون MIC

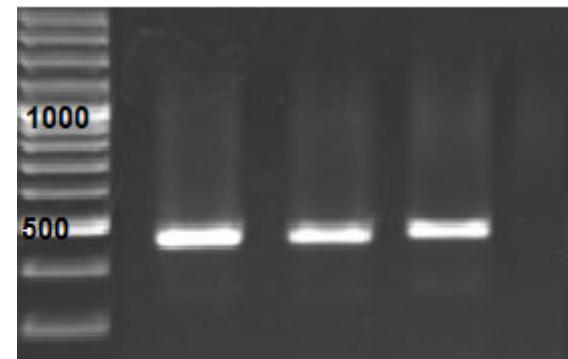
میزان MIC برای انتروکوکوس فکالیس $62/5 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ و MBC آن برای این باکتری $31/25 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ نانوذره بود.

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



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

عنوان انتروکوکوس فکالیس شناسایی شدند. مقاومت سویه-ها نسبت به آنتی بیوتیک ونکومایسین 50% ، سیپروفلوکسازین 32% ، کلرامفینیکل 15% ، تیکوپلاتین 5% ، اریترومایسین 43% ، آمیکاسین 79% ، تتراسایکلین 80% ، سفالکسین 80% ، پنی سیلین 85% ، و لینوزولید 1% بود که بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک پنی سیلین (85 درصد) و کمترین مقاومت نسبت به لینوزولید (1 درصد) بود. از بین نمونه های بررسی شده 87 درصد مقاومت به بیش از 1 آنتی بیوتیک داشتند و در نتیجه MDR بودند.

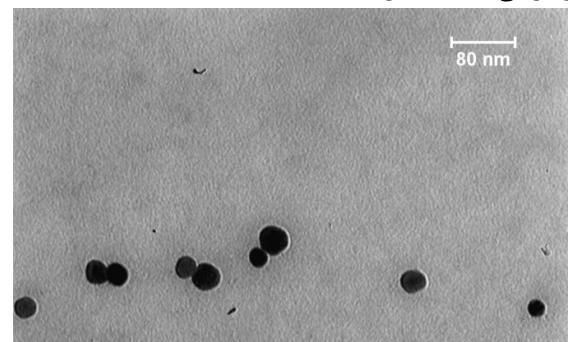


شکل ۱. نتایج الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *vanA* از چپ به راست شامل DNA Ladder، کنترل مثبت، 2 سویه مثبت حاوی ژن *vanA* و نمونه کنترل منفی است. طول قطعه مورد نظر 450 جفت باز است.

نتایج تکثیر ژن حاصل از روش PCR

در این مطالعه تمام سویه های دارای مقاومت چند دارویی حامل ژن *vanA* بودند. تکثیر ژن *vanA* در نمونه های مورد مطالعه وجود باند 450 bp را در ژل الکتروفورز نشان داد.

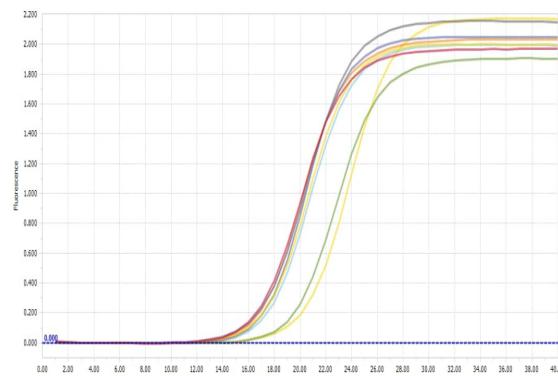
بررسی ریخت شناسی نانوذره نقره سنتز شده بررسی نانوذره نقره با میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد که نانوذرات این بررسی اکثرا شکل کروی با اندازه $22/39$ تا $93/35$ نانومتر و تعداد بسیار کمی بصورت مثلثی و مربعی است (شکل ۲).



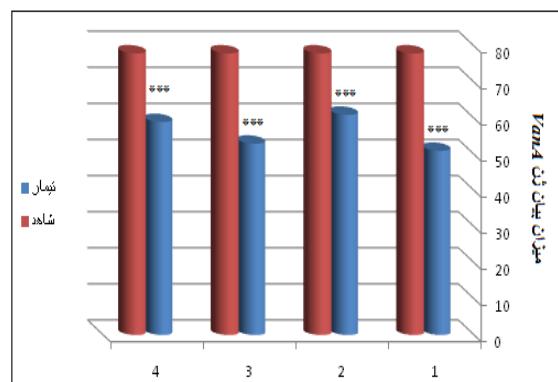
شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از نانوذره نقره ساخته شده

تأثیر نانوذرات نقره سنتز شده با زنجبيل

این باکتری را تایید می‌کند. مطالعات گستردگی در خصوص شناخت مقاومت و مکانیسم‌های وقوع مقاومت در انتروکوکوس فکالیس انجام شده است و نتایج نشان داده است که بیشترین مقاومت این باکتری به انواع گلیکولیپیدها است، ولی علاوه بر گلیکولیپیدها نسبت به سایر آنتی بیوتیک‌های نیز مقاومت وسیعی دیده می‌شود، از جمله این موارد میتوان به بتالاکتام‌ها و آمینوگلیکوزیدهایی مانند جنتامايسین و استرپتومایسین اشاره کرد (۱۲). آمینوگلیکوزیدها به دلیل خصوصیت هم افزایی که در اثر ترکیب آنها با عوامل مهار کننده دیواره سلولی مانند بتالاکتام‌ها و گلیکولیپیدها دارند؛ در عفونت‌های خطرناک گونه‌های استفاده می‌گردد (۱۳). در این مطالعه بیشترین درصد مقاومت سویه‌های انتروکوکوس فکالیس به پنی سیلین بود که قبلاً نیز گزارش شده بود (۱۴). تحقیقات گذشته در راستای نتیجه به دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهند که میزان شیوع مقاومت انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوسوس فیسیوم نسبت به سایر سویه‌های انتروکوکوس بیشتر است (۱۵). این بررسی نشان می‌دهد که ۵۰ درصد از سویه‌ها به ونکومایسین مقاوم بودند که این نتیجه با مطالعات گذشته مطابقت دارد (۱۵). دلیل وجود مقاومت در انتروکوکوس فکالیس نسبت آنتی بیوتیک‌های نظری و ونکومایسین، مجهز بودن این باکتری به انواع متنوع فاکتورهای ویرولانس است (۱۶) و این مقاومت در انتروکوکوس فکالیس در مقایسه با سایر باکتری‌ها باعث گسترش شیوع آن شده است، به طوری که اولین عامل عفونت در میان کوکسی‌های گرم مثبت عفونتزا در مجاری ادراری و سومین عامل عفونت باکتریایی در مجاری زنان در ایران پس از اشريشیا کلی و کلیسیلانومونی هستند (۱۷). مشابه با بررسی ما، مطالعه‌ای در جنوب هند انجام شد و در این تحقیق میزان مقاومت به آنتی بیوتیک‌های سفالکسین، جنتامايسین، کوتريماكسازول، ونکومایسین و لینوزولید به ترتیب ۱/۱۰۰٪، ۰/۸۵٪، ۰/۸۵٪ و صفر درصد گزارش شد (۱۸). میزان مقاومت کم به آنتی بیوتیک لینوزولید در بررسی ما نیز به دست آمد و فقط یک درصد سویه‌ها به این آنتی بیوتیک مقاوم بودند. شاید یکی از دلایل پایین بودن میزان مقاومت نسبت به لینوزولید، استفاده گستردگی نکردن از این آنتی بیوتیک در موارد درمانی باشد. در این بررسی تمام نمونه‌ها که به ونکومایسین مقاوم بودند، زن *vanA* وجود داشت. وجود زن *vanA* در نمونه‌های مقاوم به ونکومایسین در مطالعات گذشته نیز گزارش شده است (۱۹).



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



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

بحث

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

تحقیق حاضر با استفاده از آزمون MIC و MBC بهترین غلظت مهارکننده نانوذرات نقره استفاده شد. همچنین اسدی و همکارانش در سال ۱۳۹۲ نشان دادند که متغیرهایی مانند نوع باکتری، مدت زمان تماس و غلظت نانوذرات نقره عوامل مؤثر بر بروز خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره هستند (۳۳). مطالعه حاضر نشان می‌دهد که نانوذره نقره می‌تواند گزینه‌ای برای جلوگیری افزایش شیوع مقاومت در بین سویه‌های انتروکوکوس فکالیس باشد؛ لذا می‌تواند گزینه مناسبی برای درمان عفونت‌های ناشی انتروکوکوس فکالیس در بیمارستان و تغییر رویکرد درمانی باشد. این پیشنهاد در مطالعه آزادی و همکارانش در سال ۱۳۹۵ نیز ارائه شده است و آنها ارتباط معنی‌داری بین MIC نانوذره نقره در ایزوله‌های استافیلکوکوس/ورئوس با منشا جداسازی نمونه و مقاومت به متی سیلین و جنتامایسین را نشان دادند و ابزار کردنده که با توجه به پایین بودن MIC نانوذره نقره بر ایزوله‌های مقاوم به متی سیلین، امکان استفاده از آن در کنترل MRSA در عفونت بیمارستانی می‌تواند مورد توجه بیشتری قرار گیرد (۳۴). البدری و همکارانش نیز در سال ۱۴۰۰ بر خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره تاکید کردند و آن را گزینه مناسبی برای کنترل عفونت‌های بیمارستانی دانستند (۳۵).

از نتایج این مطالعه نتیجه گیری می‌شود که زن *vanA* می‌تواند به عنوان ابزار تشخیصی در شناسایی مولکولی انتروکوکوس فکالیس مقاوم به ونکومایسین استفاده شود و با توجه به پتانسل بالای نانوذره نقره بر مهار رشد این باکتری، اثر مهاری آن نباید نادیده گرفته شود.

تشکر و قدردانی

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

REFERENCES

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

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

2. Chilambi GS, Hinks J, Matysik A, Zhu X, Choo PY, Liu X, et al. Enterococcus faecalis Adapts to Antimicrobial Conjugated Oligoelectrolytes by Lipid Rearrangement and Differential Expression of Membrane Stress Response Genes. *Front Microbiol* 2020; 11:155.
3. Vestergaard M, Skive B, Domraceva I, Ingmer H, Franzyk H. Peptide/β-Peptoid Hybrids with Activity against Vancomycin-Resistant Enterococci: Influence of Hydrophobicity and Structural Features on Antibacterial and Hemolytic Properties. *Int J Mol Sci* 2021; 22:5617.
4. Markwart R, Willrich N, Eckmanns T, Werner G, Ayobami O. Low Proportion of Linezolid and Daptomycin Resistance Among Bloodborne Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Europe. *Front Microbiol* 2021; 12:664199.
5. Azad A, Rostamifar S, Modaresi F, Bazrafkan A, Rezaie Z. Assessment of the Antibacterial Effects of Bismuth Nanoparticles against *Enterococcus faecalis*. *Biomed Res Int* 2020; 2020:5465439.
6. Saeidi S, Mirnejad R, Masoumi Zavariani S, Rostasmzadeh S. Molecular Identification of Pathogenic Enterococci and Evaluation of Multi-drug Resistance in *Enterococcus* Species Isolated From Clinical samples of Some Hospitals in Tehran, Iran. *Modern Med Lab J* 2018; 1:60-7.
7. Rashid A, Molavi F, Mahmoudzadeh H. The effect of silver nanoparticles on *mecA* gene expression in methicillin-resistant samples of *Staphylococcus aureus*. *New Cell Mol Biotech* 2020; 11:67-82 [In Persian]
8. Willems RJ, Bonten MJ. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20:384-90.
9. Von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, Duyster J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia chromosome-positive leukaemia to ST1571: a prospective study. *Lancet* 2002; 359:487-91.
10. Ramirez CB, Cantey JB. Antibiotic resistance in the neonatal intensive care unit. *Neo Reviews* 2019;20: e135–ee44.
11. van Hal SJ, Willems RJL, Gouliouris T, Ballard SA, Coque TM, Hammerum AM, et al. The global dissemination of hospital clones of *Enterococcus faecium*. *Genome Med* 2021;13:52.
12. National Nosocomial Infections Surveillance System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004; 32: 470-85.
13. Harada S, Shibue Y, Aoki K, Ishii Y, Tateda K. Prevalence of High-Level Aminoglycoside Resistance and Genes Encoding Aminoglycoside-Modifying Enzymes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated in a University Hospital in Tokyo. *Jpn J Infect Dis* 2020;24;73:476-480.
14. Khodabandeh M, Mohammadi M, Abdolsalehi MR, Hasannejad-Bibalan M, Gholami M, Alvandimanesh A, Pournajaf A, Rajabnia R. High-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*; as a serious threat in hospitals. *Infectious Disorders-Drug Targets* J 2020; 20:223-8.
15. Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFG, Voss, European VRE study group. Prevalence of vancomycin-resistant Enterococci in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:816-22.
16. Jannati E, Amirmozaffari N, Saadatmand S, Arzanlou M. Faecal carriage of high-level aminoglycoside-resistant and ampicillin-resistant *Enterococcus* species in healthy Iranian children. *J Glob Antimicrob Resist* 2020;20:135-144.
17. Saifi M, Rahimi F, Nakhost Lotfi M, Pourshafie MR, Soltan Dallal MM. Prevalence and antibiotic resistance of Enterococci species isolated from two sewage treatment plants in Tehran. *Iran Bio J* 2018; 21: 250-260. [In Persian]
18. Shiadeh SMJ, Azimi L, Azimi T, Pourmohammad A, Goudarzi M, Chaboki BG, et al. Upregulation of *efrAB* efflux pump among *Enterococcus faecalis* ST480, ST847 in Iran. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2020;25;67:187-192.
19. Shafiyabi S, Mariraj J, Sumathi S, Krishna S. Emergence of vancomycin resistant Enterococci in a tertiary care hospital in South India. *Int J Pharm Biomed Res* 2013; 4: 111-113.
20. Sun L, Xu J, Wang W, He F. Emergence of vanA-Type Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* ST 78 Strain with a rep2-Type Plasmid Carrying a *Tn1546*-Like Element Isolated from a Urinary Tract Infection in China. *Infect Drug Resist* 2020; 13:949-955.
21. Sadeghian M , Habibipour R, Asghar Seif I. Effect of Silver Nano-Particle on Removing the *Enterococcus faecalis* Bacterium isolated from Industrial Resid. *mljgoums* 2015;9:133 – 138. [In Persian]

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