Original Article

Evaluation of Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles, Ciprofloxacin, and their Combination against Pseudomonas aeruginosa PAO1

Mohammad Zavarshani[1*], Malahat Ahmadi[1], Habib Dastmalchi Saei[1]

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.*

[*]***Corresponding Author:***
Mohammad Zavarshani, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Email:
dr_m_zavarshani@yahoo.com

Received: 10 Apr, 2016

Accepted: 7 Jun, 2016

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 1:16 IRST on Saturday October 21st 2017

Abstract

Background and Objectives**:** *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most common causes of secondary infections. Considering the indiscriminate use of antibiotics and the risk of antibiotic resistance, studies on identification of new antibacterial agents, have increased. The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect of silver nanoparticles, ciprofloxacin, and their combination on *P. aeruginosa PAO1*.

Methods: Inhibitory effect of silver nanoparticles and ciprofloxacin alone and their combination, was investigated on *P. aeruginosa* PAO1 using disk diffusion method. Also, using broth macrodilution method, MIC and MBC of each agent were determined. Data statistical analysis was performed using one-way ANOVA test. Significance level was considered to be $p<0.05$.

Results: Investigation of the effect of silver nanoparticles and ciprofloxacin alone on *Pseudomonas aeruginosa* showed that dilutions above 15.26mg/ml and 5.85g/ml inhibit the bacterial growth. Also, evaluation of combined effect of silver nanoparticles and ciprofloxacin showed that the plates containing combined disks of ciprofloxacin and silver nanoparticles with dilutions of 1.46µg/ml and 1.95mg/ml caused inhibition zone, respectively.

Conclusion: It seems that silver nanoparticles in combination with ciprofloxacin have synergistic effect against *Pseudomonas aeruginosa*. Therefore, this issue reduces the risk of incidence of genetic mutations in bacteria and consequently reduces the risk of developing resistant strains.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; Ciprofloxacin; Nanoparticles; Silver.

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره یازدهم، شماره پنجم، مرداد ۹۶
صفحه ۷۶ الی ۸۴

مقاله پژوهشی
(Original Article)

ارزیابی اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره، سیپروفلوکساسین و ترکیب آنها علیه *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1

محمد زوارشانی[1*]، ملاحت احمدی[1]، حبیب دستمالچی ساعی[1]

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 1:16 IRST on Saturday October 21st 2017

چکیده

زمینه و هدف: *سودوموناس آئروژینوز*، از عوامل شایع عفونت‌های ثانویه می‌باشد. با توجه به مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و خطر مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مطالعات پیرامون شناسایی ترکیبات جدید ضدباکتریایی افزایش یافته است. این مطالعه با هدف ارزیابی اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره، سیپروفلوکساسین و ترکیب آنها علیه *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 انجام شد.

روش بررسی: اثر مهارکنندگی نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین به‌تنهایی و ترکیب توأم آنها، با کمک روش انتشار دیسک بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 بررسی گردید. با استفاده از روش براث ماکرودیلوشن؛ MIC و MBC هریک از مواد تعیین شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه انجام شد. سطح معنی‌داری، $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: با بررسی اثر نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین به‌تنهایی بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* مشخص گردید به ترتیب رقت‌های بالای ۱۵/۲۶ میلی‌گرم برلیتر و ۵/۸۵ میکروگرم برمیلی‌لیتر موجب مهار رشد باکتری می‌شود. همچنین ارزیابی اثر توأم نانوذرات نقره به همراه سیپروفلوکساسین نشان داد پلیت‌های حاوی دیسک‌های ترکیبی سیپروفلوکساسین و نانوذرات نقره به ترتیب با رقت‌های ۱/۴۶ میکروگرم برمیلی‌لیتر و ۱/۹۵ میلی‌گرم برلیتر، سبب ایجاد هاله عدم رشد می‌شود.

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد نانوذرات نقره در کنار سیپروفلوکساسین می‌تواند دارای اثر هم‌افزایی بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* باشد. بنابراین، این موضوع شانس بروز جهش‌های ژنتیکی را در باکتری کاهش داده که در نتیجه خطر بروز سویه‌های مقاوم کاهش می‌یابد.

کلید واژه‌ها: *سودوموناس آئروژینوزا*؛ سیپروفلوکساسین؛ نانوذرات؛ نقره.

[1]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
محمد زوارشانی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
dr_m_zavarshani@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۷

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Zavarshani M, Ahmadi M, Dastmalchi Saei H. Evaluation of antibacterial effect of silver nanoparticles, ciprofloxacin, and their combination against pseudomonas aeruginosa pao1. Qom Univ Med Sci J 2017:11(5):76-84. [Full Text in Persian]

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 1:16 IRST on Saturday October 21st 2017

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا، یک باکتری گرم منفی و همه‌جایی بوده که قادر به ایجاد عفونت‌های شدید، به‌خصوص فرصت‌طلب در افراد دچار نقص سیستم ایمنی می‌باشد (۱). در طی سالهای گذشته، افزایش عفونت‌ها ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا*، به‌خصوص در افراد بستری در بیمارستان و مبتلا به بیماری‌های سیستمیک، چشمگیر بوده است (۲). امروزه نیز فلوروکوئینولون‌های نسل دوم و چهارم نظیر سیپروفلوکساسین و افلوکساسین به‌وفور جهت درمان عفونت‌های باکتریایی به کار می‌روند. این آنتی‌بیوتیک‌ها دارای تأثیر مثبتی علیه اغلب باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌باشند. لذا این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان داروی انتخابی جهت درمان عفونت‌های باکتریایی، به‌ویژه عفونت‌های *سودوموناسی* استفاده می‌شوند (۳). کسب مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در *سودوموناس آئروژینوزا* شایع است (۱). لذا ظهور سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در درمان عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم، به‌خصوص در زمانی‌که صرفاً از یک نوع آنتی‌بیوتیک استفاده می‌شود دور از انتظار نبوده و یک نگرانی برای متخصصین بالینی محسوب می‌گردد (۴). با توجه به افزایش مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، لزوم انجام مطالعه جهت شناخت، استفاده از ترکیبات و فرمول‌های دیگر به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها و یا ادجوانت همراه با آنها در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مختلف نظیر *سودوموناس آئروژینوزا* اهمیت پیدا می‌کند (۵). امروزه، استفاده از فلزات نظیر نقره، مس، طلا و آلومینیم در فرم‌های مختلف ازجمله نانوذرات به‌عنوان ترکیباتی آنتی‌میکروبیال و باکتریسیدال رواج پیدا کرده است (۶). از بیش از ۲۰۰۰ سال قبل، خصوصیات دارویی و درمانی نقره شناخته شده است. با شروع قرن ۱۹ میلادی، از ترکیبات نقره در تجهیزات آنتی‌میکروبیال استفاده می‌شد (۷). امروزه، از این فلز به‌عنوان ترکیبی آنتی‌باکتریال در فرم‌های مختلف استفاده می‌شود (۸). در مقایسه با فلزات دیگر، نانوذرات نقره دارای قدرت سمّیت بالایی بر روی میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. همچنین از این ذرات می‌توان با موفقیت تحت عنوان عوامل بهداشتی و دارویی، در درمان عفونت‌ها استفاده کرد (۹).

نانوذرات نقره علاوه بر خاصیت ضدباکتریایی مؤثر؛ دارای اثرات ضدویروسی، ضدقارچی، همچنین ضدالتهابی نیز می‌باشد (۱۰). باتوجه به تأثیرات ضدمیکروبی نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین می‌توان امیدوار بود این مواد بتوانند اثرات یکدیگر را بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* تقویت کنند. مطالعات متعدد روی ترکیب آنتی‌بیوتیک‌ها و نانوذرات فلزی، نشان داده است میکروارگانیسم‌های مختلف چه گرم مثبت و چه گرم منفی، تحت‌تأثیر این اثرات سینرژیستی قرار می‌گیرند. با این حال، بخش قابل‌وجهی از مطالعات نشان می‌دهد این اثرات به‌طورکلی روی باکتری‌های گرم منفی مؤثرتر از باکتری‌های گرم مثبت بوده است (۱۲،۱۱). به‌عنوان مثال، اثر ضدباکتریایی ترکیب نانوذرات نقره و آمپی‌سیلین روی باکتری‌های *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* به ترتیب ۱/۸ و ۲/۴ برابر افزایش نشان داده؛ درحالی‌که این اثر روی *Staphylococcus aureus* تنها ۰/۲ برابر افزایش داشته است (۱۱). همچنین تأثیر هم‌افزایی نانوذرات نقره در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، ونکومایسین و استرپتومایسین بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* در مطالعات مختلف تأیید شده است (۱۴-۱۲). ارزیابی اثر هم‌افزایی نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند مفید باشد و از نتایج آن می‌توان در جهت مقابله با عفونت‌های ناشی از این پاتوژن استفاده کرد. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره، سیپروفلوکساسین و ترکیب آنها علیه *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، باکتری *سودوموناس آئروژینوزا سویه* PAO1 از بخش میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه تهیه گردید. جهت کشت و تکثیر باکتری، از محیط مولر هینتون آگار (Merck, Germany) استفاده شد.

به‌منظور بررسی تأثیر نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین، سوسپانسیون ۰/۵ مک‌فارلند از باکتری تهیه گردید (۱۴)؛ بدین منظور، ابتدا استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند با استفاده از سولفات باریم ($BaSo_4$) تهیه شد و سپس استانداردهای مک‌فارلند با افزودن

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 1:16 IRST on Saturday October 21st 2017

حجم خاصی از محلول‌های اسید سولفوریک ۱٪ و باریم کلرید ۱/۱۷۵٪ برای به‌دست آوردن یک محلول سولفات باریم با دانسیته نوری خاص تهیه گردید. (به‌طور معمول، استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند حاوی ۹۹/۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۱٪ و ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید باریم ۱/۱۷۵٪، بیشتر کاربرد دارد.) استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند، کدورتی معادل با یک سوسپانسیون باکتریایی حاوی $1/5\times10^{8}$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر ایجاد می‌کند و برای تهیه سوسپانسیون میکروبی ۰/۵ مک‌فارلند، نیاز به کشت ۲۴ساعته از باکتری می‌باشد. در ادامه، ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، باکتری از کشت ذخیره به محیط کشت آگار مغذی منتقل گردید و پس از رشد کشت مربوطه، به‌منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی از پرگنه‌های به‌وجودآمده استفاده شد. سپس مقداری از سوسپانسیون میکروبی، داخل لوله استریل درب‌دار حاوی نرمال‌سالین ریخته شد و کدورت آن با اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر، اندازه‌گیری و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت محلول ۰/۵ مک‌فارلند، با نرمال‌سالین رقیق گردید.

محلول نانوذرات نقره به‌صورت یک ویال ۴ لیتری با سایز ۲۰-۳ نانومتر {با نام تجاری Nanocolloid از شرکت نانوسید (NANOCID)} تهیه شد. از استوک اصلی محلول مذکور که دارای غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم برلیتر بود به روش Serial Dilution رقت‌سازی با نسبت ۱:۱ با آب مقطر استریل انجام شد. غلظت‌های به‌دست‌آمده عبارت بودند از: ۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲، ۷/۸۱، ۳/۹۱، ۱/۹۵، ۰/۹۷۷، ۰/۴۸۸ و ۰/۲۴۴ میلی‌گرم برلیتر.

محلول سیپروفلوکساسین نیز به‌صورت قطره چشمی ۳٪ (هر ۱۰۰ میلی‌لیتر حاوی ۰/۳ گرم سیپروفلوکساسین) از شرکت سینا دارو - تهران تهیه گردید. با توجه به غلظت دارو، هر میلی‌لیتر از محلول، حاوی ۳۰۰۰ میکروگرم سیپروفلوکساسین بود. بر این اساس، سریال رقت‌های تهیه‌شده با نسبت ۱:۱ و غلظت‌های به‌دست‌آمده بر حسب میکروگرم برمیلی‌لیتر شامل: ۳۰۰۰، ۱۵۰۰، ۷۵۰، ۳۷۵، ۱۸۷/۵، ۹۳/۷۵، ۴۶/۸، ۲۳/۴، ۱۱/۷۱، ۵/۸۵، ۲/۹۲، ۱/۴۶، ۰/۷۳۱، ۰/۳۶۵ و ۰/۱۸۲ بود. به‌منظور ارزیابی تأثیر توأم نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین؛ محلولی متشکل از دو ماده مذکور تهیه شد؛ بدین صورت که ابتدا از استوک هریک از مواد، ۱۰۰۰ میکرولیتر برداشته و در داخل یک لوله استریل ریخته شد که غلظتی متشکل از ۲۰۰۰ میلی‌گرم برلیتر نانوذرات نقره و ۱۵۰۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر سیپروفلوکساسین به دست آمد. سپس رقت‌سازی محلول حاصل با نسبت ۱:۱ به‌صورت سریال انجام گرفت. پس از تهیه محلول‌های مورد نیاز جهت انجام آزمایش، دیسک‌های بلانک به مدت یک‌ساعت در ۲۰ میکرولیتر از محلول‌های تهیه‌شده با غلظت‌های فوق‌الذکر قرار داده شدند و در نهایت، این دیسک‌ها بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (حاوی سوسپانسیون باکتریایی معادل ۰/۵ مک‌فارلند از باکتری مورد مطالعه) قرار گرفتند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. پس از این مدت براساس استانداردهای کمیته ملی معیارهای آزمایشگاهی بالینی (NCCLS)، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها به‌وسیله خط‌کش اندازه‌گیری شد. تمامی موارد یادشده با دو تکرار انجام گرفت.

جهت تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده باکتری (MBC)؛ رقت‌های مختلف، مشابه آنچه که در روش انتشار دیسک توضیح داده شد تهیه گردید، با این تفاوت که به جای آب مقطر استریل از محیط مولر هینتون براث، استفاده و رقت‌سازی در داخل لوله استریل انجام شد. پس از تهیه رقت‌های مورد نظر، به هر لوله ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی ۰/۵ مک‌فارلند اضافه گردید. لوله‌های آماده‌شده به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. برای تعیین MIC، ۱۰۰ میکرولیتر از مایع داخل هریک از لوله‌ها بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار، منتقل و با استفاده از آنس استریل بر روی محیط کشت پخش گردید. سپس پلیت‌های تهیه‌شده به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با شرایط مذکور انکوبه شدند. پس از این زمان، اولین لوله از غلظت‌های پایین تهیه‌شده برای سه ترکیب مورد مطالعه که فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری بودند، به‌عنوان غلظت MIC و اولین لوله از غلظت‌های تهیه‌شده که در آن ۹۹/۹٪ از مقدار اولیه باکتری‌های اضافه‌شده از بین رفته بود و در کشت مجدد تنها ۱٪ از باکتری‌ها رشد کرده بودند به‌عنوان غلظت MBC

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 1:16 IRST on Saturday October 21st 2017

محاسبه گردید. تمای مراحل یادشده با دو تکرار انجام شد. نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ و تست آماری واریانس یک‌طرفه تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، p<۰/۰۵ در نظرگرفته شد.

یافته‌ها

در پلیت‌های حاوی دیسک آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و نانوذرات نقره به‌تنهایی در رقت‌های ۵/۸۵ میکروگرم برمیلی‌لیتر و ۱۵/۲۶ میلی‌گرم برلیتر، هاله عدم رشد مطابق با CLSI ایجاد شد (جدول شماره ۱ و ۲)، این در حالی بود که دیسک‌های تهیه‌شده از ترکیب توأم دو ماده مذکور در رقت‌های ۱/۴۶ میکروگرم برمیلی‌لیتر سیپروفلوکساسین و ۱/۹۵ میلی‌گرم برلیتر نانوذرات نقره، هاله عدم رشد ایجاد کردند (جدول شماره ۳، شکل).

همچنین نتایج تعیین میزان MIC و MBC نشان داد میزان MBC ترکیب توأم سیپروفلوکساسین و نانوذرات نقره بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب در غلظت ۱/۹۵ میلی‌گرم برلیتر نانوذرات نقره و ۱/۴۶ میکروگرم برمیلی‌لیتر سیپروفلوکساسین و میزان MIC در غلظت ۰/۹۷۷ میلی‌گرم برلیتر نانوذرات نقره و ۰/۷۳۱ میکروگرم برمیلی‌لیتر سیپروفلوکساسین بوده است (جدول شماره ۴). آنالیز آماری نتایج نشان داد نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین دارای اثر ضدباکتریایی برروی *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 می‌باشند. همچنین ترکیب توأم این ذرات و سیپروفلوکساسین دارای اثر هم‌افزایی بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* بودند.

جدول شماره ۱: قطر هاله عدم رشد باکتری (برحسب میلی‌متر) در رقت‌های مختلف نانوذرات نقره (برحسب میلی‌گرم برلیتر).

رقت	۰/۲۴۴	۰/۴۸۸	/۹۷۷	۱/۹۵	۳/۹۱	۷/۸۱	۱۵/۶۲	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰	۴۰۰۰
قطر هاله	۰/۵	۳	۷	۹	۱۱	۱۳	۱۵	۱۷	۱۹	۲۱	۲۳	۲۶	۳۰	۳۳	۳۸

جدول شماره ۲: قطر هاله عدم رشد باکتری (برحسب میلی‌متر) در رقت‌های مختلف سیپروفلوکساسین (برحسب میکروگرم برمیلی‌لیتر).

رقت	۰/۱۸۲	۰/۳۶۵	۰/۷۳۱	۱/۴۶	۲/۹۲	۵/۸۵	۱۱/۷۱	۲۳/۴	۴۶/۸	۹۳/۷۵	۱۸۷/۵	۳۷۵	۷۵۰	۱۵۰۰	۳۰۰۰
قطر هاله	۱	۵	۱۰	۱۱	۱۳	۱۵	۱۷	۱۹	۲۱	۲۲	۲۵	۲۷	۳۱	۳۴	۴۰

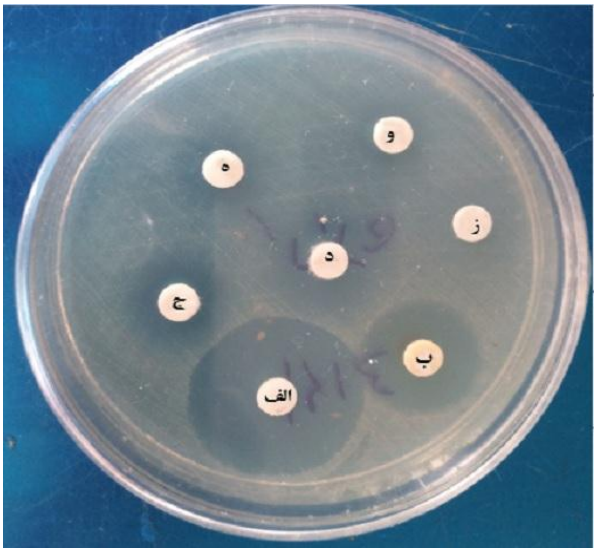
جدول شماره ۳: قطر هاله عدم رشد باکتری (برحسب میلی‌متر) در رقت‌های مختلف ترکیب نانوذرات نقره + سیپروفلوکساسین.

شماره رقت	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	١٤
نانوذرات نقره	۰/۲۴۴	۰/۴۸۸	۰/۹۷۷	۱/۹۵	۳/۹۱	۷/۸۱	۱۵/۶۲	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰
سیپروفلوکساسین	۰/۱۸۲	/۳۶۵	/۷۳۱	۱/۴۶	۲/۹۲	۵/۸۵	۱۱/۷۱	۲۳/۴	۴۶/۸	۹۳/۷۵	۱۸۷/۵	۳۷۵	۷۵۰	۱۵۰۰
قطر هاله	۷	۱۰	۱۳	۱۵	۱۶	۱۸	۲۲	۲۵	۲۸	۳۱	۳۵	۳۸	۴۰	۴۲

جدول شماره ٤: نتایج MIC و MBC در رقت‌های مختلف نانوذرات نقره (برحسب میلی‌گرم برلیتر)، سیپروفلوکساسین (برحسب میکروگرم برمیلی‌لیتر) و ترکیب نانوذرات نقره + سیپروفلوکساسین.

نام ماده	MIC	MBC
نانوذرات نقره	۱۵/۶۲	۳۱/۲۵
سیپروفلوکساسین	۵/۸۵	۱۱/۷۱
نانوذرات نقره	۰/۹۷۷	۱/۹۵
+سیپروفلوکساسین	۰/۷۳۱	۱/۴۶

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 1:16 IRST on Saturday October 21st 2017



شکل: هاله عدم رشد در رقت‌های مختلف ترکیب نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین.
الف) نانوذرات نقره ۳/۹۱ میلی‌گرم برلیتر، سیپروفلوکساسین ۲/۹۲ میکروگرم برمیلی‌لیتر.
ب) نانوذرات نقره ۱/۹۵ میلی‌گرم برلیتر، سیپروفلوکساسین ۱/٤٦ میکروگرم برمیلی‌لیتر.
ج) نانوذرات نقره ۹۷۷/ میلی‌گرم برلیتر، سیپروفلوکساسین ۷۳۱/ میکروگرم برمیلی‌لیتر.
د) نانوذرات نقره ٤٨٨/ میلی‌گرم برلیتر، سیپروفلوکساسین ۳٦٥/ میکروگرم برمیلی‌لیتر.
ه) نانوذرات نقره ۲٤٤/ میلی‌گرم برلیتر، سیپروفلوکساسین ۱۸۲/ میکروگرم برمیلی‌لیتر.
و) نانوذرات نقره ۱۲۲/ میلی‌گرم برلیتر، سیپروفلوکساسین ۰۹۱/ میکروگرم برمیلی‌لیتر.
ز) دیسک بلانک (کنترل).

بحث

سودوموناس آئروژینوزا، پاتوژنی فرصت‌طلب در ایجاد عفونت‌های مختلف می‌باشد که معمولاً عفونت ایجادشده توسط این باکتری به سرعت منجر به نکروز بافت می‌شود (۱۵). خصوصیات میزبانی نظیر وضعیت سیستم ایمنی، همچنین فاکتورهای حدت میکروبی در بروز عفونت‌های ناشی از این جرم مؤثر است. از فلوروکوئینولون‌ها به‌طور وسیع در درمان عفونت *سودوموناسی* استفاده می‌شود (۱۶). همچنین این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها در شرایط آزمایشگاهی دارای تأثیرات مثبت چشمگیری برعلیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مولد عفونت‌های مختلف می‌باشند (۱۷). در سالهای اخیر با توجه به معضلات استفاده طولانی‌مدت از آنتی‌بیوتیک‌ها، انجام مطالعات حول محور شناخت فرآورده‌ها و ترکیبات جدید مؤثر برعلیه باکتری‌های گرم منفی و مثبت مسبب عفونت‌های مختلف و به‌طور شاخص، عفونت‌های *سودوموناسی* در شرایط آزمایشگاهی و یا در عفونت‌های تجربی ایجادشده در مدل‌های حیوانی افزایش یافته است.

Onlen و همکاران (سال ۲۰۰۷)، جهت درمان کراتیت تجربی ایجادشده ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* در خرگوش، از بره موم استفاده کردند، نتایج نشان داد بره موم به‌تنهایی تأثیر محدودی بر روی درمان کراتیت ایجادشده دارد (۱۵). همچنین استفاده از باکتریوسین‌ها و فرآورده‌های خارج سلولی باکتری به‌عنوان ترکیبات آنتی‌میکروبی، به‌خصوص ضدباکتریایی در مطالعات مختلف ارزیابی شده است. در این مطالعات، از باکتریوسین تولیدشده به‌وسیله لاکتوباسیلوس‌ها، با موفقیت برعلیه *سودوموناس آئروژینوزا* استفاده شده است (۱۹،۱۸). در مطالعه حاضر از نانوذرات نقره به‌عنوان ترکیبی آنتی‌باکتریال برعلیه *سودوموناس آئروژینوزا* استفاده شد. تحقیقات زیادی پیرامون نانوذرات نقره (تحت عنوان ترکیبات ضدمیکروبی) صورت گرفته است. Markowska و همکاران (سال ۲۰۱۳) گزارش کردند نانوذرات نقره دارای تأثیرات مشخصی بر بیوفیلم ایجادشده توسط باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد (۲۰). تأثیر ضدمیکروبی بسیار بالای نانوذرات نقره بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از بیماران در نتایج مطالعات Afren و همکاران (سال ۲۰۱۱) نیز مشاهده می‌شود (۲۱).

همچنین یافته‌های مطالعات مختلف، خصوصیات ضدمیکروبی و باکتریوسیدال این ذرات را برروی *سودوموناس آئروژینوزا* در شرایط in vitro به‌خوبی تأیید می‌کند (۲۳،۲۲،۱۰)، که این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی داشت. تأثیر نانوذرات نقره برروی *سودوموناس*‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک جداشده از سوختگی‌ها توسط Singh و همکاران (سال ۲۰۱۴) نیز انجام گرفت، آنها گزارش کردند از نانوذرات نقره می‌توان به‌عنوان ترکیبی ضدباکتریایی برعلیه عفونت‌های *سودوموناسی* مقاوم به آنتی‌بیوتیک در شرایط in vitro استفاده کرد (۲۴). همچنین باتوجه به خصوصیات مشخص ضدمیکروبی این ذرات، محققان برآن شدند تا بتوانند با ترکیب این ذرات و موادی دیگر، خصوصیات ضدباکتریایی محصول ایجادشده را افزایش دهند. به‌طور مثال ترکیب نانوذرات نقره و کیتوزان استات برعلیه *سودوموناس آئروژینوزا* ایجادکننده عفونت در بیماران دچار سوختگی، ارزیابی و محصول ایجادشده در غالب لباس بر تن بیماران دچار سوختگی بررسی گردید. نتایج این تحقیق نشان داد محصول مذکور دارای تأثیر مشخص در پیشگیری از بروز عفونت ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* بوده است (۲۵). میرزایی و همکاران گزارش کردند ترکیب آلیسین و نانوذرات نقره دارای اثر هم‌افزایی علیه عفونت پوستی ناشی از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد. MIC و MBC به‌دست‌آمده در این پژوهش با نتایج مطالعه حاضر شباهت فراوانی داشت (۲۶). کسب مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به‌وسیله *سودوموناس آئروژینوزا*، از مشکلات درمان انحصاری آنتی‌بیوتیکی عفونت‌های ناشی از این باکتری می‌باشد. بنابراین، ترکیب نانوذرات نقره و آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند ایده مناسبی جهت کاهش وقوع مقاومت دارویی باشد. در مطالعه Brown و همکاران (سال ۲۰۱۲)، از ترکیب نانوذرات نقره و آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در جهت از بین بردن *سودوموناس*‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد ترکیب فوق به سرعت می‌تواند این قبیل سویه‌های مقاوم را تخریب کند (۲۷). با اینکه مطالعه مذکور برروی سویه‌های مقاوم انجام شده بود، ولی تا حدود زیادی با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت.

Birla و همکاران (سال ۲۰۰۹) از ترکیب نانوذرات نقره و آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، استرپتومایسین و ونکومایسین برعلیه *سودوموناس آئروژینوزا* استفاده کردند. نتایج مطالعه آنها نشان داد ترکیب نانوذرات نقره و هریک از آنتی‌بیوتیک‌های مذکور دارای اثرات هم‌افزایی مشخص می‌باشد (۱۱). مقایسه این نتایج با مطالعه حاضر نشان داد غلظتی که در آن هاله عدم رشد باکتری در ترکیب نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین تشکیل شده، کمتر از غلظت‌های مطالعه مذکور بوده است. این موضوع می‌تواند به دلیل تفاوت در سایز نانوذرات مورد استفاده و یا مکانیسم عمل آنتی‌بیوتیک استفاده‌شده باشد. یکی از عوامل مؤثر بر اثرات ترکیبی نانوذره و آنتی‌بیوتیک، نوع نانوذره و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آنها است. خصوصیاتی نظیر اندازه ذرات، شکل و پایداری نانوذرات، کاملاً روی برهمکنش آنها با آنتی‌بیوتیک‌ها تأثیرگذار است. فعالیت ضدمیکروبی بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها در حضور نانوذرات نقره، با اندازه‌ای بین ۴۰-۵ نانومتر افزایش می‌یابد و این اثر در محدوده اندازه ذره‌ای ۱۵-۵ نانومتر بسیار بیشتر است (۲۸).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر و سایر تحقیقات انجام‌گرفته حاکی از آن است که نانوذرات نقره می‌تواند ترکیبی آنتی‌باکتریال برعلیه باکتری‌های مختلف باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد ترکیب این ذرات با آنتی‌بیوتیکی اختصاصی نظیر سیپروفلوکساسین منجر به تأثیرگذاری بیشتر دارو بر روی ارگانیسم می‌شود. لذا استفاده از ترکیب دو ماده مورد مطالعه در شرایط آزمایشگاهی بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* دارای مزیت‌های مختلفی به شرح زیر است:

۱- استفاده توأم نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین با یکدیگر دارای اثر هم‌افزایی بوده و در نتیجه میزان دوز مصرفی هرکدام از ترکیبات و مدت زمان لازم جهت از بین بردن باکتری در مقایسه با استفاده از هرکدام از آنها به تنهایی کاهش می‌یابد، بنابراین عوارض مصرف طولانی‌مدت این دو ماده به تنهایی کاهش می‌یابد؛ ۲- استفاده توأم از نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین،

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 1:16 IRST on Saturday October 21st 2017

شانس بروز جهش‌های ژنتیکی را به‌منظور مقاومت در برابر دارو در باکتری کاهش می‌دهد.

با توجه به مشکلاتی‌که در مسیر درمان عفونت‌های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* نظیر بروز سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک وجود دارد، انجام مطالعات جدی‌تر و کاربردی‌تر پیرامون استفاده از ترکیبات و یا فرآورده‌های آنتی‌باکتریال جدید، به‌منظور درمان این‌گونه عفونت‌ها حایز اهمیت است.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر حاصل بخشی از پایان‌نامه دانشجویی مقطع دکتری باکتری‌شناسی (به شماره رهگیری ۱۱۶۰۵۵۹) می‌باشد. نویسندگان این مقاله از تمامی افرادی‌که داوطلبانه ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر می‌کنند.

References:

1. Kapoor R, Wadman MW, Dohm MT, Czyzewski AM, Spormann AM, Barron AE. Antimicrobial peptoids are effective against Pseudomonas aeruginosa biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2011;55(6):3054-57.

2. Fazeli H, Akbari R, Moghim S, Narimani T, Arabestani MR, Ghoddousi AR. Pseudomonas aeruginosa infections in patients, hospital means, and personnel's specimens. J Res Med Sci 2012;17(4):332–7.

3. Lee SK, Park DC, Kim MG, Boo SH, Choi YJ, Byun JY, et al. Rate of isolation and trends of antimicrobial resistance of multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa from otorrhea in chronic suppurative otitis media. Clin Exp Otorhinolaryngol 2012;5(1):17–22.

4. Amirulhusni A, Palanisamy N, Mohd-Zain Z, Jian Ping L, Durairaj R. Antibacterial effect of silver nanoparticles on multi drug resistant Pseudomonas aeruginosa. Int Sch Sci Res Innov 2012;6(7):208-11.

5. Rajawat S, Qureshi MS. Study on bactericidal effect of biosynthesized silver nanoparticles in combination with Gentamicin and Ampicillin on Pseudomonas aeruginosa. Nano Hybrid 2013;3(2):37-49.

6. Parameswari E, Udayasoorian C, Paul Sebastian S, Jayabalakrishnan RM. The bactericidal potential of silver nanoparticles. Int Res J Biotechnol 2010;1(3):44-9.

7. Parabhu S, Poulose E. Silver nanoparticles: Mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications and toxicity effects. Int Nano Lett 2012;2(32):2-10.

8. Paredes D, Ortiz C, Torres R. Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of ag nanoparticles against Escherichia coli O157:H7 and methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Int J Nanomedicine 2014;9(3):1717–29.

9. Wong K, Liu X. Silver nanoparticles- The real silver bullet in clinical medicines. Med Chem Comm 2010;1(2):125-31.

10. Chen M, Yang Z, Wu H, Pan X, Xie X, Wu C. Antimicrobial activity and the mechanism of Silver Nanoparticles thermosensitive gel. Int J Nanomedicine 2011;6(4):2873-77.

11. Birla SS, Tiwari VV, Gade AK, Ingle AP, Yadav AP, Rai MK. Fabrication of silver nanoparticles by Phoma glomerata and its combined effect against Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. Lett Appl Microbiol 2009;48(2):173-9.

12. Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalaichelvan PT, Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: A study against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanomedicine 2010;6(1):103-9.

13. Ruden S, Hilper K, Berditsch M, Wadhwani P, Ulrich AS. Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. Antimicrob Agents Chemother 2009;53(4):3538-40.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 1:16 IRST on Saturday October 21st 2017

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 1:16 IRST on Saturday October 21st 2017

14. Gordon O, Slenters TV, 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(3):4208–18.

15. Onlen Y, Tamer C, Oksuz H, Duran N, Altug ME, Yakan S. Comparative trial of different anti-bacterial combinations with propolis and ciprofloxacin on Pseudomonas keratitis in rabbits. Microbiol Res 2007;162(1):62-8.

16. Deschaght P, Van Daele S, De Baets F, Vaneechoutte M. PCR and the detection of Pseudomonas aeruginosa in respiratory samples of CF patients, a literature review. J Cyst Fibros 2011;10(5):293-7.

17. Banoee M, Seif S, Nazari ZE, Jafari-Fesharaki P, Shahverdi HR, Moballegh A, et al. ZnO nanoparticles enhanced antibacterial activity of Ciprofloxacin against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2010;93(2):557-61.

18. Kanagaraj J, Tamil Selvi A, Senthilvelan T, NChandra Babu NK, Chandrasekar B. Evaluation of new bacteriocin as a potential short-term preservation for goat skin. Am J Microbiol Res 2014;2(3):86-93.

19. Jamalifar H, Rahimi HR, Samadi N, Shahverdi AR, Sharifian Z, Hosseini F, et al. Antimicrobial activity of different Lactobacillus species against multi- drug resistant clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Iran J Microbiol 2011;3(1):21–5.

20. Markowska K, Grudniak AM, Wolska KI. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. Acta Biochim Pol 2013;60(4):523-30.

21. Afreen A, Rathod V, Ranganath E. Synthesis of monodispersed Silver Nanoparticles by Rhizipus stolonifer and its antibacterial activity against MDR strains of Pseudomonas aeruginosa from burnt patients. Int J Environ Sci 2011;1(7):1830-40.

22. Devi J, Valentin Bhimba B. Antibacterial and antifungal activity of silver nanoparticles synthesized using Hypnea muciformis. Biosci Biotechnol Res Asia 2014;11(1):235-8.

23. Oza G, Pandey S, Shah R, Sharon M. Extracellular fabrication of silver nanoparticles using Pseudomonas aeruginosa and its antimicrobial assay. Pelagia Res Library 2012;3(3):1776-83.

24. Singh K, Panghal M, Kadyan S, Chaudhary U, Yadav J. Green silver nanoparticles of Phyllanthus amarus: As an antibacterial agent against multi drug resistant clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. J Nanobiotechnol 2014;12(40):1-9.

25. Huang L, Dai T, Xuan Y, Tegos GP, Hamblin MR. Synergistic combination of chitosan acetate with nanoparticle silver as a topical antimicrobial: Efficacy Against bacterial burn infections. Antimicrob Agents Chemother 2011;55(7):3432-8.

26. Mirzaei F, Salouti M, Shapouri R, Alizadeh H. Antibacterial effect of allicin, silver nanoparticles, and their combination against skin infection due to Pseudomonas aeruginosa in Animal model. J Fasa Univ Med Sci 2014;4(3):311-17. [Full Text in Persian]

27. Brown AN, Smith K, Samuels TA, Lu J, Obare SO, Scott ME. Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of Pseudomonas aeruginosa and Enterobacter aerogenes and Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Appl Environ Microbiol 2012;78(8):2768-74.

28. Shahverdi AR, Fakhimi A, Shahverdi HR, Minaian S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Nanomedicine 2007;3(2):168-71.