

# Investigation of Synergism of Silver Nanoparticle and Erythromycin Inhibition and Detection of Exotoxin-A Gene in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Wounds Secretion

Danial Dehghan<sup>1</sup>, Mahdi Fasihi-Ramandi<sup>2</sup> , Ramezan Ali Taheri<sup>3\*</sup>

1. Student Research Committee, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Molecular Biology Research Center, Systems biology and poisonings institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

 [10.30699/ijmm.14.4.379](https://doi.org/10.30699/ijmm.14.4.379)



## ABSTRACT

**Background:** *Pseudomonas aeruginosa* infections are resistant to antimicrobial agents and produce toxic virulence factors such as exotoxin A. Studies have shown that some nanoparticle compounds and antibiotics have a synergistic effect. Therefore, the aim of this study was to investigate the synergistic effect of silver nanoparticles and erythromycin on antibiotic-resistant *P. aeruginosa*.

**Materials & Methods:** In this descriptive cross-sectional study, 40 cultured samples of burn wound secretions were taken from Imam Musa Kazem (PBUH) Burns Hospital in Isfahan, Iran. Diagnostic and differential tests were performed. AntibioGram was performed to obtain the bacterial resistance pattern and the exotoxin A gene was detected by PCR. The bacterial minimum inhibitory concentration (MIC) was then applied to the silver nanoparticles (shape and mean size) and erythromycin separately and a common mixture of both in 10 dilutions to investigate the synergistic effect.

**Results & Conclusion:** A number of 26 bacteria were strains of *P. aeruginosa*. Of samples, 25 (96.15%) had exotoxin A gene. All samples were sensitive to all erythromycin concentrations. The mean MIC of nanoparticles against bacteria was reported to be 2 µg/mL. A solution of 40 µg/mL erythromycin and 2 µg/mL nanoparticles was also considered as MIC solution. *Pseudomonas aeruginosa* is sensitive to erythromycin to very low concentrations of silver particles. But no synergistic effect between silver nanoparticles and erythromycin was reported for this bacterium. Based on PCR results and antibiotic resistance pattern, a significant number of the samples contained the exotoxin A gene and the use of erythromycin alone was not appropriate for treatment.

**Keywords:** Silver nano particles, *Pseudomonas aeruginosa*, Erythromycin, Minimum inhibitory concentration (MIC), Exotoxin A

Received: 2019/07/07;

Accepted: 2020/08/17;

Published Online: 2020/08/17

## Corresponding Information:

Ramezan Ali Taheri, Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email: [taheri@bmsu.ac.ir](mailto:taheri@bmsu.ac.ir)



Copyright © 2020, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Dehghan D, Taheri R.A, Fasihi-Ramandi M. Investigation of Synergism of Silver Nanoparticle and Erythromycin Inhibition and Detection of Exotoxin-A Gene in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Wounds Secretion. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (4) :379-387

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

## Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* is a gram-negative, non-fermenting, opportunistic, and highly invasive bacillus with an increasing resistance to antimicrobials. It is the normal flora of the skin and intestines that causes

respiratory, urinary tract, and gastrointestinal infections, keratitis, otitis, and bacteremia in patients with weakened immune systems (such as cancer, burns, AIDS, cystic fibrosis). These infections often cause death

(1). The antibiotic resistance of this bacterium is a major health problem that has increased the cost of treating this disease. Therefore, the limitations of treatment and complications of the disease are also rising (2).

*P. aeruginosa* pathogens include exotoxin A, exoenzyme S, phospholipase C, and pyocyanin (3). Exotoxin A is one of the main components of the type 2 secretion system that causes tissue necrosis and has a function similar to diphtheria toxin. The toxin inhibits protein synthesis by ADP-ribosylation of elongation factor 2 (4). Inhibition of this toxin reduces cell damage. Nowadays, various antimicrobials are known to prevent the growth of resistant bacteria and to eliminate resistance to antibiotics. Nanoparticles are a broad class of substances with antimicrobial properties. Silver nanoparticle (AgNPs) are best known for their high index of antimicrobial effects.

AgNPs are used for various purposes in medicine (5). They are used as a new antimicrobial agent for sterilization (6). They have high antimicrobial effects on various organisms (1, 7). These nanoparticles accumulate in the bacterial membrane and cause cavities, resulting in unstable cell membrane arrangement and increased permeability (8).

Studies have shown that AgNPs in most cases inhibit the formation of biofilms in *P. aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. This property can be used in medicine in the future (9). There are also several studies on the synergistic effect of AgNPs and antibiotics. Mirnejad *et al.* (2013) showed that streptomycin and AgNPs have a synergistic effect with each other (10, 11). Ahmadi *et al.* (2017) also showed the synergistic effect of tetracycline and AgNPs. They reported a synergistic relationship for wound healing and microbial inhibition (12).

The production of this material is economically valuable. The methods of synthesis of AgNPs have been reviewed and described according to recent studies and approaches which include the physical, photochemical, biological, and chemical approaches. Some examples of chemical approach include the synthesis of nanoparticles using aqueous polymers, the synthesis of AgNPs using low molecular weight compounds as a double dispersing agent, and the method of one-step synthesis of AgNPs-C sintered at temperature (2).

Clindamycin, erythromycin, and imipenem antibiotics are used to treat pseudomonas infections, but the resistance to them is increasing. Therefore, the most effective way to prevent increased resistance is to use alternative antimicrobials and combine other antimicrobials with antibiotics. In this study, first, the antibiotic resistance of erythromycin and AgNPs were evaluated, and then a test was designed to evaluate the synergistic effect of these two substances on clinical samples in vitro.

## Materials and Methods

### Sampling and Identification of Samples

The present descriptive cross-sectional study was conducted during December 2017 and June 2018. A total of 40 samples were extracted by simple random sampling from the wounds of burn patients admitted to Imam Musa Kazem Hospital in Isfahan, Iran. The samples were identified using standard biochemical and microbiological tests. Samples were first cultured on eosin methylene blue medium (Ibersco, Italy). Then, hot staining, catalase, oxidase, glucose, fermentation, oxidation, and TSI (Triple Sugar Iron) tests were used to diagnose *P. aeruginosa*. After identification, *P. aeruginosa* was stored in Tryptic Soy Broth medium (Merck, Germany) with 15% glycerol in a research laboratory at 4°C (13).

### Preparation of nanoparticles

To prepare the nanoparticles, we added 640 µg of AgNPs into 10 mL of double distilled water, then used an ultrasonic device (Skymen/China) for two hours to homogenize the solution.

### Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Erythromycin

The MIC of bacterial growth for erythromycin was determined by microdilution method. In this study, 100 µl of bacterial culture medium at a concentration of 0.5 McFarland was added in a ratio of one to ten to all wells except the first column. Then, in the first column, sterile culture medium and the highest inhibitory concentration without bacteria were used for the negative control group. In column 12, only the culture medium solution and 200 µl of bacteria without any inhibitors as a positive control were added.

### MIC of Nanoparticles

The concentration of AgNPs was based on one-half by microdilution method. Therefore, dilution series was prepared in 96-well plates from 125-250-500-1000-2000-4000-8000-16000-32000-64000 ng/mL. The concentration of erythromycin was also determined as a half with a dilution series of 7.81-15.62-31.25-62.5-125-250-500-1000-2000-4000 ng/mL. The plates were then placed in an incubator at 37°C for 24 h to grow. Then, 0.5 McFarland turbidity was prepared from bacteria according to standard buffer (10<sup>6</sup> C 6CFU/mL) (6).

### Preparation of Nanoparticle Solution with Antibiotics

The solution of the purchased AgNPs was mixed with 40 µg of erythromycin; then the solution was homogenized using an ultrasonic device for two hours, and the solution was stored at ambient temperature.

### MIC of Mixture of Nanoparticles and Antibiotics

Microdilution method was used to determine the MIC of bacterial growth against nanoparticles and antibiotics. Mixture of 100 µl AgNPs was poured from

the second column of the microplate into the third column, and then 100  $\mu$ l of solution was poured from the second column into the fourth column, and this process continued until column eleven. Finally, dilution series was obtained from a mixture of AgNPs with antibiotics.

#### PCR Test

To test and confirm the samples, the samples were cultured on Müller-Hinton agar medium. After 24 hours of heating, the main bacterial genome was isolated using a gene extraction kit from Sinaclon Company (Sinagen, Iran). For PCR, pairs of ETA primers with Forward 5'-GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC-3'

and Reverse 5'-CGCTGGCCATTCGCTCCAGCGCT-3' primer sequences with a product length of 396 bp were used (14). Also, from Mastermix containing 2.5  $\mu$ l of PCR buffer, 1  $\mu$ l of MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ l of dNTPs, 0.5  $\mu$ l of taq polymerase enzyme (Sinaclon, Iran), along with 1  $\mu$ l of each primer and 3  $\mu$ l of template DNA of 25  $\mu$ l was prepared and placed in the device. The PCR steps are listed in Table 1 to identify the ETA gene in *P. aeruginosa*. These steps were repeated 34 times. The results of amplification of the fragments were electrophoresed on 1% agarose gel and was observed after staining the gel using DNA safe stain. The standard strain used in this study is *P. aeruginosa* ATCC 27853 bought from the Microbial Bank of Iran.

Table 1. Polymerase chain reaction conditions for exotoxin A gene amplification in *Pseudomonas aeruginosa*

	Time	Temperature
<b>First denaturation</b>	5 min	95°C
<b>Denaturation</b>	1 min	95°C
<b>Annealing</b>	1 min	65.4°C
<b>Extension</b>	1 min	72°C
<b>Final Extension</b>	1 min	72°C

## Results & Discussion

#### Results of MIC of Erythromycin

The results of MIC examination showed complete resistance to erythromycin. In this study, the growth of *P. aeruginosa* was not stopped in any of the cells and all the cells belonging to the inhibitory concentrations (2-11) had turbidity due to the growth of *P. aeruginosa*.

#### Results of MIC of AgNPs

The minimum inhibitory concentration of bacterial growth was 2000  $\mu$ g/mL. In this study, turbidity due to

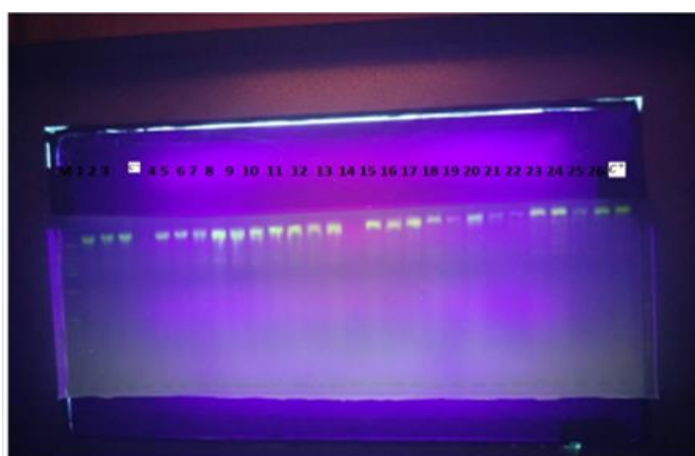
the growth of *P. aeruginosa* was observed in cells with a concentration of less than 2000  $\mu$ g/mL.

#### Results of Synergy of AgNPs and Erythromycin

Lack of growth was observed for synergistic results in cell number 7 (2000) and turbidity due to growth of *P. aeruginosa* was still observed in lower concentrations.

#### Results of exotoxin A Gene Prevalence

Out of 26 *P. aeruginosa* samples, 24 had exotoxin A gene. The prevalence of *P. aeruginosa* exotoxin A gene in this study was 96.15% of the total samples (Figure 1).



**Figure 1.** Extraction of exotoxin A gene and polymerase chain reaction on agarose gel. Leader in the first column and negative control between columns 3-4 and positive control in the last column are visible. In this figure, the standard strain *Pseudomonas azuginosa* ATCC 27853 was bought from the Microbial Bank of Iran.

### Mechanism of Antimicrobial Effect of AgNPs and Erythromycin

In the introduction section, we discussed the mechanism of nanoparticles that act on cell membranes. Erythromycin, which has a known mechanism of action on protein synthesis, is described in detail in Ketolide section of the chapter 28 of the Jawetz Medical Microbiology; it binds to the S50 component of ribosomes on SrRNA23, interfering with the formation of the initial complex of peptide chain synthesis.

In this study, the prevalence of exotoxin A and antibiotic resistance by microdilution method and the synergistic effect between AgNPs and erythromycin on bacterial inhibition were investigated. According to the findings, the MIC for AgNPs with a diameter of 20-100 nm against *P. aeruginosa* in well 7 was reported 2 µg/mL.

Also, erythromycin could not be used against *P. aeruginosa* and all strains obtained were resistant to this antibiotic. The suitable concentration of AgNPs to prevent the growth of *P. aeruginosa* was 2 µg/mL. In testing the antimicrobial effect of a mixture of antibiotics erythromycin and AgNPs against the growth of *P. aeruginosa*, this bacterium did not show growth in the well 7 at a concentration of 2 µg/mL.

The prevalence of *P. aeruginosa* exotoxin A gene in this study was 96.15% of the total samples. This toxin is one of the pathogens of this bacterium. This study showed that the predominant population of *P. aeruginosa* produces the secretion of exotoxin A burn wound. One of the important factors in the pathogenicity of *P. aeruginosa* is the production of exotoxin A, which causes serious health problems, and therefore, by performing a test for the presence or absence of this factor, more effective diagnosis and treatment can be performed.

Shinashal *et al.* conducted a study on the effect of silver and gentamicin on *P. aeruginosa* by disk diffusion method and found that the antimicrobial effect of AgNPs was better than that of gentamicin; 250 mg of gentamicin and 10 mg of AgNPs were reported (7). In the present study, the antimicrobial effect of AgNPs was reported 2 µg, which is less than that reported by Shinashal *et al.* The size of the nanoparticles is probably the reason for their increased antimicrobial properties.

Marck *et al.* (2014) studied the synergy of AgNPs and azithromycin against *P. aeruginosa* PAO1 biofilm. In this study, AgNPs in the sizes of 10 nm, 20 nm, 40 nm, 60 nm, and 100 nm were used and each of these concentrations were mixed with 0.234 µg/mL, 0.625 µg/mL and 1.25 µg/mL, 2.5 µg/mL, and 7.5 µg/mL of aztreonam antibiotic, respectively; then the MIC was evaluated. The best concentration of AgNPs was

reported to be 0.13 µg/mL for 10 µm and 0.500 µg/mL for 20 nm. AgNPs may also have a synergistic relationship with azithromycin against inhibition of *P. aeruginosa* (15). The results of this study were consistent with the present study.

He T. *et al.*, in an experiment on the antibacterial effect and analysis of graphene-based AgNPs proteome on the pathogen *P. aeruginosa*, concluded that *P. aeruginosa* did not grow at 5 µg/mL in the first 7-9 hours but had a slight growth after 48 hours, which was considered as the MIC of bacterial growth inhibitor. It has also been reported that growth stopped at 20 µg/mL and this concentration was considered as the minimum lethal concentration (16). This concentration is consistent with the present study and shows that the antimicrobial effect of AgNPs on *P. aeruginosa* is positive.

Sondi *et al.* (2004) studied the effect of AgNPs as antimicrobial agents on *Escherichia coli*, as a gram-negative bacterial model. They found that AgNPs with a diameter of 12 nm and a concentration of 10 µg cm<sup>-3</sup> were able to stop the growth of *E. coli* by 70% and they significantly reduced the growth at a concentration of 20 µg cm<sup>-3</sup> and completely stopped the growth at a concentration of 50-60 µg cm<sup>-3</sup> (8).

Kalishwaralal *et al.* (2010) showed that AgNPs inhibit biofilm formation by *P. aeruginosa* and *S. epidermidis*; AgNPs with a diameter of 50 nm were performed by well test method. The diameter of the inhibitory region of 100 nM AgNPs was reported 9.5±0.9 mm for *P. aeruginosa* and 12±1.2 mm for *S. epidermidis*; also, for blocking exopolysaccharide (Biofilm), 50 nM was reported for both bacteria (9). The results of the present study are also consistent with the results of the study by Kalishwaralal *et al.* Finally, it is recommended that this test be performed with other antibiotics.

### Conclusion

Exotoxin A is one of the main pathogens of *P. aeruginosa*. The bacterium is sensitive to AgNPs that have effects on microbes. AgNPs can be used in a way that they are not harmful to host cells. *P. aeruginosa* is resistant to erythromycin and has no effect on it. Due to the fact that AgNPs and erythromycin were used together and there was no change in the inhibitory concentration, these two antimicrobials have no synergistic effect on this bacterium.

### Acknowledgment

Thanks to guidance and advice from "Clinical Research Development Unit of Baqiyatallah Hospital".

### Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.



## اثر سینرژیسیم نانوذره نقره و اریترومایسین علیه سودوموناس آئروژینوزا و ردیابی ژن اگزوتوکسین A جدا شده از ترشح زخم‌های سوختگی

دانیال دهقان<sup>۱</sup>، مهدی فصیحی رامندی<sup>۲</sup>، رضمانعلی طاهری<sup>۳\*</sup>

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات بیولوژی ملکولی، پژوهشکده سیستم بیولوژی و مسمومیت ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

۳. مرکز تحقیقات نانو بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به آنتی‌بیوتیک معمولاً سخت درمان می‌شوند و آنتی‌بیوتیک‌های محدودی برای درمان وجود دارد. مقاومت این ارگانیسم نسبت به عوامل ضد میکروبی در حال افزایش است و فاکتورهای بیماری‌زای آن نیز مشخص شده است. لذا در این مطالعه کوتاه، اثر سینرژیسیم نانوذره نقره و اریترومایسین علیه سودوموناس آئروژینوزا دارای اگزوتوکسین A جدا شده از ترشح زخم‌های سوختگی بررسی شد.

**مواد و روش کار:** در این مقاله کوتاه، ۴۰ نمونه از محل ترشح زخم‌های سوختگی با سوآب گرفته شد و با انجام تست‌های تشخیصی و افتراقی استاندارد ۲۶ نمونه سودوموناس آئروژینوزا جدا گردید. وجود ژن اگزوتوکسین A با روش PCR و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش کربی بائر ارزیابی شد. سپس اثر مخلوط نانو ذره نقره و اریترومایسین در ۱۰ رقت برای بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی به صورت میکروبدلوشن و مقایسه با نتایج الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی استفاده شد.

**یافته‌ها و نتیجه‌گیری:** از ۲۶ نمونه سودوموناس آئروژینوزا ۲۵ نمونه واجد ژن اگزوتوکسین A بودند. برای حداقل غلظت مهارتی، این باکتری نسبت به نانو ذرات نقره حساس و نسبت به اریترومایسین مقاوم بود. در آخر اینکه هیچ گونه همکاری بین این دو ماده برای مهار این باکتری وجود نداشت.

**کلید واژه‌ها:** نانو ذرات نقره، سودوموناس آئروژینوزا، اریترومایسین، حداقل غلظت مهارتی، اگزوتوکسین A

کپی‌رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۱۶

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۲۷

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۵/۲۷

### موضوع:

نانو بیوتکنولوژی در پزشکی

### نویسنده مسئول:

رضمانعلی طاهری،

مرکز تحقیقات نانو بیوتکنولوژی،

دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)،

تهران، ایران

ایمیل: [taheri@bmsu.ac.ir](mailto:taheri@bmsu.ac.ir)

### مقدمه

اغلب باعث مرگ و میر بیماران می‌شوند (۱). سودوموناس آئروژینوزا فاکتورهای بیماری‌زایی مانند اگزوتوکسین A، اگزوآنزیم S، فسفولیپاز C، پیوسیانین دارد (۳). یکی از فاکتورهای بیماری‌زایی این باکتری اگزوتوکسین A است که یکی از اجزای اصلی سیستم ترشحاتی نوع ۲ بوده و باعث نکروز بافتی است. اگزوتوکسین A، عملکردی شبیه توکسین دیفتری دارد. این توکسین سنتز پروتئین را به وسیله ADP-

سودوموناس آئروژینوزا یک باسیل گرم منفی فاقد قدرت تخمیر، فرصت طلب با قدرت تهاجمی است که به عوامل ضد میکروبی مقاوم است. افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری یک مشکل بزرگ برای سلامت است. این ارگانیسم فلور طبیعی پوست و روده است که باعث عفونت‌های تنفسی، عفونت مجاری ادراری، عفونت گوارشی، کراتیت، اوتیت و باکتری می در بیماران با سیستم ایمنی ضعیف (مثل سرطان، سوختگی، ایدز، سیستمیک فیبروز) می‌شود. این عفونت‌ها



ریبوزیلاسیون فاکتور طویل سازی ۲ مهار می‌کند و در شدت بیماری‌زایی نقش دارد (۴).

امروزه مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از مکانیسم‌های مختلف در این باکتری، گسترش یافته است و ضد میکروب‌های گوناگونی برای درمان آن ساخته شده است. نانو ذره نقره در زمینه پزشکی و میکروبیولوژی کاربرد دارند و امروزه برای درمان باکتری‌های بیماری‌زا نیز استفاده می‌شوند (۱، ۵). این نانو مواد به روش‌های گوناگونی تولید می‌شوند که اندازه و شکل‌های متفاوتی را ایجاد می‌کند (۲).

مطالعات اخیر نشان داده است که نانو ذرات نقره که فعالیت ضد میکروبی وسیع الطیفی بر علیه بیشتر میکروارگانیسم‌ها دارند (۱، ۶). در مطالعات گذشته، نشان داده شد که آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و نانو ذرات نقره دارای رابطه سینرژیسیم از نوع هم افزایی برای مهار رشد میکروب‌ها دارند (۷). لذا با توجه به مطالعات گذشته، در مطالعه کوتاه حاضر به بررسی اثر هم‌افزایی نانوذره نقره و آنتی‌بیوتیک اریترومایسین برای جلوگیری از رشد نمونه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* پرداخته شد.

## روش پژوهش

### نمونه گیری

در این مطالعه مقطعی - توصیفی کوتاه، تعداد ۴۰ نمونه از ترشح زخم بیماران سوختگی به روش تصادفی ساده جدا شد. نمونه‌ها با تست‌های بیوشیمیایی و افتراقی میکروبیولوژی بررسی شدند. در ابتدا نمونه‌ها روی محیط آئوزین متیلن بلو کشت داده شد سپس برای تشخیص *سودوموناس آئروژینوزا* از تست‌های رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، تست گلوکز، تخمیر، اکسیداسیون و TSI (triple sugar iron) استفاده شد. *سودوموناس آئروژینوزا* پس از شناسایی، توسط محیط کشت تریپتیک سوی براث با گلیسرول ۱۵٪ به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شد (۸).

### تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی برای نانوذرات،

#### اریترومایسین و مخلوط هر دو

در این پژوهش مقدار ۱۰۰ mL از محیط کشت مولر هینتون (مرک، آلمان) همراه با *سودوموناس آئروژینوزا* به تناسب یک به ده

از محلول باکتری با کدورت نیم مک فارلند تهیه شد. مخلوط به درون تمام چاهک‌های میکروپلیت به جز ستون اول ریخته شد. در سه خانه اول از ستون اول گروه کنترل منفی ایجاد شد که از محیط کشت استریل و از محیط کشت و بالاترین غلظت مهاری بدون باکتری استفاده شد. در چاهک‌های بعدی ستون اول، فقط محلول محیط کشت و باکتری بدون هیچ ماده مهاری به عنوان کنترل مثبت به مقدار ۲۰۰ µl ریخته شد. در ادامه سریال رقت از نانوذرات نقره بر پایه یک دوم با روش میکرودیولوشن تهیه شد. بنابراین سریال رقت در پلیت های ۹۶ خانه از ۶۴۰۰۰-۱۲۵ ng/mL تهیه شد. غلظت اریترومایسین هم به صورت یک دوم با سریال رقت ۴۰۰۰-۷/۸۱ ng/mL تهیه شد و به پلیت‌ها اضافه شد. سپس پلیت‌ها برای رشد درون انکوباتور با دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. تعداد باکتری معادل کدورت نیم مک فارلند استفاده شد (۶).

### آزمون PCR برای بررسی وجود ژن اگزوتوکسین A

از نمونه‌هایی که بر اساس تست‌های استاندارد، به عنوان *سودوموناس آئروژینوزا* در نظر گرفته شده بود، بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری، استخراج DNA با کیت استخراج ژن از سیناکلون (سیناکلون، ایران) انجام شد. سپس از پرایمرهای زیر (پرایمرهای ETA) برای انجام PCR، استفاده شد. مشخصات پرایمرها شامل،

Forward 5'-GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC-3'

Reverse 5'-CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT-3'

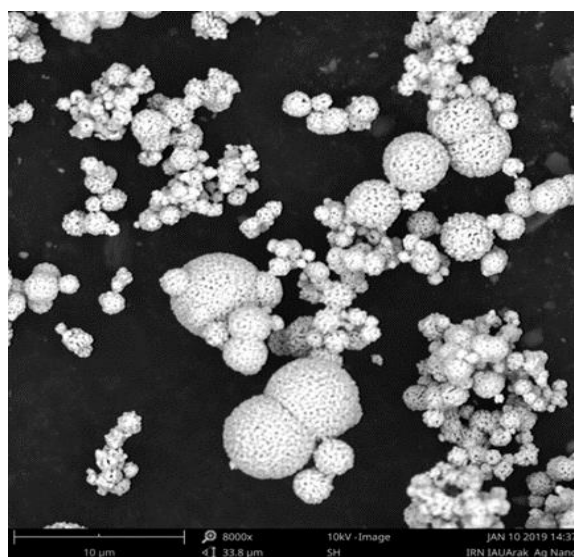
با طول محصول ۳۹۶bp گزارش گردید. هم چنین از مسترمیکس حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱ میکرولیتر  $MgCl_2$  ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم taq پلی مراز، به همراه یک میکرولیتر از هر پرایمر (با غلظت ۱ پیکومول) و ۳ میکرولیتر DNA الگو با حجم ۲۵ میکرولیتر آماده و در دستگاه قرار داده شد. مرحله افزایش دما (آلینینگ) و بسط و افزایش نهایی ۳۴ مرتبه تکرار شد. شرایط Setup واکنش PCR برای شناسایی ژن ETA در *سودوموناس آئروژینوزا* در جدول یک آمده است. در ادامه، وجود ژن اگزوتوکسین A، روی کروموزوم باکتری با روش PCR و در کنار مارکر 100+ bp بر روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی ژل با استفاده از DNA safe stain، نتایج مشاهده شد.

جدول ۱. شرایط مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از ژن اگزوتوکسین A در سودوموناس آئروژینوزا

	Time	Temperatures
First denaturation	5 min	95°C
Denaturation	1 min	95°C
Annealing	1 min	65.4°C
Extension	1 min	72°C
Final Extension	1 min	72°C

جدول ۲. کمترین مقدار غلظت مهاری برای نانو ذرات نقره و اریترومايسين بر علیه باکتری سودوموناس آئروژینوزا

اریترومايسين	اریترومايسين و نانو ذره نقره	نانو ذرات نقره
مقاوم	حساس + مقاوم	حساس
مقاوم	۲۰۰۰ ng/mL + مقاوم	۲۰۰۰ ng/mL



شکل ۲. استخراج ژن اگزوتوکسین A و انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مرز بر روی ژل آگاروز

شکل ۱. نمای میکروسکوپ الکترونی از نانو ذرات نقره

## یافته‌ها و بحث

آئروژینوزا، مقاومت باکتریایی بود و این باکتری نسبت به اریترومايسين حساسیت نشان نداد. در تستی که نانو ذره نقره با اریترومايسين مخلوط گردید، این باکتری در چاهک ۶ غلظت ۲۰۰۰ ng/mL بدون رشد گزارش شد.

در این مطالعه، ژن اگزوتوکسین A سودوموناس آئروژینوزا در ۹۶/۱۵ درصد (۲۵ نمونه) مشاهده شد. لذا به نظر می‌رسد که ۲۵ نمونه بالینی، این توکسین را تولید می‌کردند. این توکسین از فاکتورهای بیماری‌زایی قوی در باکتری است. نتایج این پژوهش نشان داد جمعیت غالب سودوموناس آئروژینوزا اگزوتوکسین A را تولید

در این مطالعه کوتاه، تعداد ۲۶ سویه سودوموناس آئروژینوزا از ۴۰ نمونه مشکوک، شناسایی شد. و تمام نمونه‌ها برای وجود ژن اگزوتوکسین A ارزیابی شدند، همچنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش میکرودیولوشن بررسی شده و اثر هم‌افزایی بین نانو ذره نقره و اریترومايسين بر مهار باکتریایی گزارش شد.

بر طبق یافته‌ها در این پژوهش مقدار حداقل غلظت مهاری برای نانو ذرات نقره با قطر nm ۲۰-۱۰۰ بر علیه سودوموناس آئروژینوزا در چاهک ۶ با غلظت ۲۰۰۰ ng/mL گزارش شد. نتیجه کمترین غلظت مهاری برای اریترومايسين علیه سودوموناس

باعث به وجود آمدن حفره‌هایی می‌شود و در نتیجه نفوذپذیری غشا سلولی بهم خورده و افزایش می‌یابد (۱۳). در این خصوص مطالعات بیشتری نیاز است و مطالعه حاضر به بررسی این موضوع نپرداخته است.

در مقاله دیگری نیز که Kalishwaralal و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در مقاله‌ای با عنوان نانو ذرات نقره مانع تشکیل بیوفیلم توسط سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اپیدرمیس می‌شود نشان دادند که نانو ذرات نقره در ۹۵٪ موارد موجب مهار سودوموناس آئروژینوزا در تشکیل بیوفیلم می‌شود که می‌تواند بعداً در علم پزشکی کاربرد داشته باشد (۱۴).

### نتیجه‌گیری

یکی از عوامل اصلی بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا آگزوتوکسین A است که توسط این باکتری تولید و دارای نقش اصلی در بیماری‌زایی این باکتریست. این باکتری به نانو ذرات نقره حساس است که دارای فعالیت وسیع الطیفی برای میکروبهاست. سودوموناس آئروژینوزا نسبت به اریترومایسین مقاوم بوده و این آنتی‌بیوتیک تأثیری برای درمان آن ندارد. با توجه به اینکه نانو ذره نقره و اریترومایسین توام با هم نیز استفاده شد و تغییری در کاهش غلظت مهار کنندگی وجود نداشت این دو ماده ضد میکروبی هیچ گونه اثر سینرژیسیم با هم ندارند.

### سپاسگزاری

با تشکر از همکاری‌ها، راهنمایی‌ها و مشاوره‌های “واحد توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان بقیه الله (عج)”.

### تعارض در منافع

این مقاله پژوهشی مستقل است که بدون حمایت مالی سازمانی انجام شده است. در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافی نداشته‌اند.

می‌کردند. تولید این توکسین، باعث بروز مشکلات جدی در زمینه سلامت می‌شود. لذا با انجام تست مولکولی برای تشخیص وجود ژن عامل تولیدکننده این توکسین، در صورت وجود آن، تشخیص و درمان می‌تواند با رویکرد بهتری انجام شده و برنامه درمانی موثرتری را در نظر گرفته شود.

مطالعات دیگری نیز در زمینه هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک‌ها و نانوذرات برای درمان سودوموناس آئروژینوزا انجام شده است. در تحقیقی که Shinashal درباره هم‌افزایی نقره و جنتامایسین روی سودوموناس آئروژینوزا به روش کربی‌بائر انجام داد، مشخص شد که قدرت ضد میکروبی نانو ذرات نقره بسیار بیشتر از جنتامایسین بود که دوز جنتامایسین ۲۵۰ میلی‌گرم و نانوذره نقره ۱۰ میلی‌گرم گزارش شد (۶). در مطالعه حاضر نیز، اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره بیشتر از اثر ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک گزارش شد.

در مقاله دیگری که Habash و همکارانش در سال ۲۰۱۴ درباره بررسی سینرژیسیم نانوذرات نقره و اریترومایسین بر علیه بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا PAOI ارائه دادند مشخص شد که نانو ذرات نقره به تنهایی باعث مهار این باکتری شده است و همچنین نانوذرات نقره می‌تواند با اریترومایسین رابطه سینرژیسیم بر علیه مهار سودوموناس آئروژینوزا داشته باشد (۱۱). در این مطالعه نیز نشان داده شد که نانوذرات نقره به تنهایی می‌توانند اثرات ضد میکروبی داشته، اما اثر هم‌افزایی با آنتی‌بیوتیک نداشته باشند. مطالعه دیگری توسط He T و همکارانش در سال ۲۰۱۴ با عنوان تأثیر آنتی‌باکتریال و آنالیز پروتئوم نانو ذرات نقره بر پایه گرافین بر روی باکتری بیماری‌زای سودوموناس آئروژینوزا ارائه شد و مشخص گردید که نانو ذرات نقره بر پایه گرافین قدرت کشندگی بالایی علیه این باکتری داشتند (۱۲).

در مقاله دیگری Sondi و همکارانش که در سال ۲۰۰۴ بر روی نانوذرات نقره به عنوان عوامل ضد میکروبی با استفاده از ایشیریشیا کلی که به عنوان یک مدل باکتری گرم منفی انتخاب شد مشخص شد که نانو ذرات نقره در غشای باکتری تجمع کرده و

### Referance

- Sharma BK, Saha A, Rahaman L, Bhattacharjee S, Tribedi P. Silver inhibits the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Adv Microbiol*. 2015 Sep 7;5(10):677. [DOI:10.4236/aim.2015.510070]
- Natsuki J, Natsuki T, Hashimoto Y. A review of silver nanoparticles: synthesis methods, properties and applications. *Int. J. Mater. Sci. Appl*. 2015;4(5):325-32. [DOI:10.11648/j.ijmsa.20150405.17]



3. Lee VT, Smith RS, Tümmler B, Lory S. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun.* 2005 Mar 1;73(3):1695-705. [[DOI:10.1128/IAI.73.3.1695-1705.2005](https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1695-1705.2005)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
4. Kaszab E, Szoboszlay S, Dobolyi C, Háhn J, Pék N, Kriszt B. Antibiotic resistance profiles and virulence markers of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from composts. *Bioresour Technol.* 2011 Jan 1;102(2):1543-8. [[DOI:10.1016/j.biortech.2010.08.027](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.027)] [[PMID](#)]
5. Seshadri S, Prakash A, Kowshik M. Biosynthesis of silver nanoparticles by marine bacterium, *Idiomarina* sp. PR58-8. *Bull Mater Sci.* 2012 Dec 1;35(7):1201-5. [[DOI:10.1007/s12034-012-0417-0](https://doi.org/10.1007/s12034-012-0417-0)]
6. Shinashal RZ. The effect of Silver nanoparticles in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Pharmaceut Sci Res.* 2019;11(1):58-60.
7. Ahmadi M, Adibhesami M. The effect of silver nanoparticles on wounds contaminated with *pseudomonas aeruginosa* in mice: An experimental study. *IJPR.* 2017;16(2):661.
8. Nasiri A, Gharebagh RA, Nojoumi SA, Akbarizadeh M, Harirchi S, Arefnezhad M. et al. Evaluation of the antimicrobial activity of silver nanoparticles on antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *IJBMS.* 2016 Jun 29;1(1):25-8. [[DOI:10.15171/ijbsm.2016.06](https://doi.org/10.15171/ijbsm.2016.06)]
9. Yousefi-Avarvand A, Khashei R, Ebrahim-Saraie HS, Emami A, Zomorodian K, Motamedifar M. The frequency of exotoxin A and exoenzymes S and U genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Shiraz. *IJMCM.* 2015;4(3):167.
10. Salas-Orozco M, Niño-Martínez N, Martínez-Castañón GA, Méndez FT, Jasso ME, Ruiz F. Mechanisms of Resistance to Silver Nanoparticles in Endodontic Bacteria: A Literature Review. *J Nanomater.* 2019;2019. [[DOI:10.1155/2019/7630316](https://doi.org/10.1155/2019/7630316)]
11. Habash MB, Park AJ, Vis EC, Harris RJ, Khursigara CM. Synergy of silver nanoparticles and aztreonam against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Oct 1;58(10):5818-30. [[DOI:10.1128/AAC.03170-14](https://doi.org/10.1128/AAC.03170-14)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
12. He T, Liu H, Zhou Y, Yang J, Cheng X, Shi H. Antibacterial effect and proteomic analysis of graphene-based silver nanoparticles on a pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals.* 2014 Aug 1;27(4):673-82. [[DOI:10.1007/s10534-014-9756-1](https://doi.org/10.1007/s10534-014-9756-1)] [[PMID](#)]
13. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci.* 2004 Jul 1;275(1):177-82. [[DOI:10.1016/j.jcis.2004.02.012](https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012)] [[PMID](#)]
14. Kalishwaralal K, BarathManiKanth S, Pandian SR, Deepak V, Gurunathan S. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010 Sep 1;79(2):340-4. [[DOI:10.1016/j.colsurfb.2010.04.014](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.04.014)] [[PMID](#)]