

Evaluating Antibacterial Effects of Silver Nanoparticles on *blaTEM* Gene Expression in *Escherichia Coli* Strain Resistant to Beta-Lactam Antibiotic

Valid Albadiri

Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran, sahelyazdanpanahi@gmail.com

Farahnaz Molavi*

Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran, farahmolavi@gmail.com

Maryam Tehranipoor

Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran, maryam@gmail.com

Abstract

Introduction: So far, studies have shown that an important reason for *Escherichia coli* resistance to beta-lactam antibiotics is the presence of broad-spectrum beta-lactamases (ESBLs) which are the product of *SHV* and *TEM* gene expression. Some studies also show that the use of nanoparticles can be effective in eliminating bacterial resistance. Therefore, the present study aimed to investigate the effects of silver nanoparticles on the expression of the *blaTEM* beta-lactamase resistance gene and determine the pattern of antibiotic resistance in existing *Escherichia coli* samples.

Materials and Methods: In this cross-sectional descriptive study, 64 *Escherichia coli* were collected from 11 medical diagnostic laboratories. These samples were identified using standard laboratory methods and specific cultures. The PCR method was used to evaluate the frequency of the *blaTEM* gene. To evaluate the antibiotic susceptibility pattern of the strains, the disk diffusion method was performed based on the CLSI protocol. Silver nanoparticles were synthesized from the ginger extract and real-time PCR was used to investigate the effect of silver nanoparticles on *blaTEM* gene expression.

Results: From 64 *Escherichia coli* resistant samples, 61 samples were beta-lactamase resistant. Phenotypic evaluation of the antibiotic resistance pattern of beta-lactamase-resistant *Escherichia coli* strains showed that 90% was resistant to penicillin, 66% to carbapenem, 87% to isolates to erythromycin, 85% to cefotaxime 84% to ceftriaxone, 49% to gentamicin, 37% to spirofloxacin, 22% to imipenem, and 12% to linezolid. The highest antibiotic resistance belonged to penicillin (90%) and erythromycin (87%) and the lowest to imipenem (22%) and linezolid (12%), respectively. Molecular analysis showed the presence of the *blaTEM* gene in all samples. The results of the real-time method showed that the effect of silver nanoparticles on *blaTEM* gene expression was significant.

Discussion and Conclusion: The presence of 61 resistant samples out of 64 samples in the present study indicates an increase in the resistance of *Escherichia coli* to various antibiotics, which could be a serious concern for the treatment of infections caused by *Escherichia coli*. The effectiveness of silver nanoparticles on *blaTEM* gene expression suggests that it could be a good alternative to existing antibiotics.

Key words: *E. Coli*, Antibiotic Resistance, Beta-lactamase, *blaTEM*, Silver Nanoparticles

* Corresponding author

Received: December 6, 2020 / **Accepted:** April 17, 2021

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)

سال دهم، شماره ۳۹، پاییز ۱۴۰۰، صفحه ۱۰۰ - ۸۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۲۸

Doi: [10.22108/BJM.2021.125907.1353](https://doi.org/10.22108/BJM.2021.125907.1353)

بررسی اثرات ضدباکتریایی نانوذرات نقره بر بیان ژن *blaTEM* در سویه *اشرشیا کلی* مقاوم به آنتی‌بیوتیک بتالاکتام

ولید البدیری: دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران، sahelyazdanpanahi@gmail.com

فرحناز مولوی*: استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران، farahmolavi@gmail.com

مریم طهرانی‌پور: دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران، maryam@gmail.com

چکیده

مقدمه: تاکنون نتایج نشان داده است دلیل مهم مقاومت باکتری *اشرشیا کلی* به آنتی‌بیوتیک بتالاکتام، وجود بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف (ESBLs) است که محصول بیان ژن‌های *SHV* و *TEM* هستند. همچنین، مطالعات زیادی نشان می‌دهند استفاده از نانوذرات می‌تواند برای از بین بردن مقاومت باکتری‌ها مؤثر باشد؛ بنابراین، هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر نانوذرات نقره بر میزان بیان ژن مقاومت به بتالاکتاماز *blaTEM* و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *اشرشیا کلی* است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی - توصیفی ۶۴/اشرشیا کلی از ۱۱ آزمایشگاه تشخیص طبی جمع‌آوری شده و با استفاده از روش‌های استاندارد آزمایشگاهی و کشت اختصاصی تأیید هویت شده‌اند. برای بررسی وجود ژن *blaTEM* از روش PCR استفاده شد. به منظور ارزیابی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، روش انتشار دیسک براساس پروتکل CLSI انجام شد. نانوذره نقره با عصاره زنجبیل ساخته و برای بررسی اثر نانوذره نقره بر بیان ژن *blaTEM* از روش Real time PCR استفاده شد.

نتایج: از ۶۴ سویه *اشرشیا کلی* مقاوم ۶۱ سویه به بتالاکتام مقاوم بودند. ارزیابی فنوتیپی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اشرشیا کلی* مقاوم به بتالاکتام نشان داد ۹۰ درصد به پنی‌سیلین، ۶۶ درصد به کربنی‌سیلین، ۸۷ درصد به اریترومایسین، ۸۵ درصد به سفوتاکسیم، ۸۴ درصد به سفتریاکسون، ۴۹ درصد به جنتامایسین، ۳۷ درصد به سپروفلوکساسین ۲۲ درصد به ایمپنم و ۱۲ درصد به لینزولید مقاومت داشتند؛ یعنی بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب متعلق به پنی‌سیلین (۹۰ درصد) و اریترومایسین (۸۷ درصد) و کمترین نسبت به ایمپنم (۲۲ درصد) و لینزولید (۱۲ درصد) بود. بررسی مولکولی نشان‌دهنده حضور ژن *blaTEM* در تمام سویه‌ها بود. نتیجه بررسی ریل تایم روی ۳ سویه که وجود ژن *blaTEM* در آنها توسط PCR تأیید شده بود و تحت تیمار نانوذرات نقره قرار گرفته بودند نشان داد تأثیر نانوذرات نقره بر بیان ژن *blaTEM* معنادار و کاهش یافته است و می‌تواند با کاهش بیان ژن *blaTEM* و کاهش ترشح آنزیم‌های بتالاکتاماز در باکتری، اثربخشی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را افزایش و مقاومت باکتری را به این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها کاهش دهد.

بحث و نتیجه‌گیری: وجود ۶۱ سویه مقاوم از ۶۴ سویه در مطالعه حاضر نشان‌دهنده افزایش مقاومت *اشرشیا کلی* مقاوم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بوده که این مسئله یک هشدار جدی برای درمان عفونت‌های ناشی از *اشرشیا کلی* است. موثر بودن نانوذره نقره بر بیان ژن *blaTEM* نشان می‌دهد این ماده می‌تواند یک جایگزین خوب یا همراه مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌های موجود مدنظر باشد.

واژه‌های کلیدی: *اشرشیا کلی*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بتالاکتاماز، *blaTEM*، نانوذره نقره

* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2021, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

اشرشیا کلی^۱ یک باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که به‌طور عمده در روده جانوران خونگرم زندگی می‌کند (۱). بیشتر گونه‌های این جنس بی‌خطر و هم‌زیست‌اند؛ اما گاهی گونه‌هایی از آنها وجود دارند که باعث مسمومیت می‌شوند (۲). گونه اشرشیا کلی به دلیل اینکه عامل شایع ایجاد عفونت مجاری ادراری^۲ است، از لحاظ پزشکی مهم‌ترین گونه این جنس است. یکی از روش‌های رایج باکتری‌ها برای مقابله با آنتی‌بیوتیک‌ها تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز است. آنزیم‌های بتالاکتاماز که با ژن‌های پلاسمیدی، ترانسپوزونی و کروموزوم‌های باکتریایی کد می‌شوند یکی از مکانیسم‌های عمومی مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتاماند و این مسئله موجب مقاومت این میکروارگانیسم‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌شود (۳). وقوع عفونت مجاری ادراری ناشی از سویه‌های اشرشیا کلی دارای بتالاکتام، در حال افزایش است. با توجه به افزایش روزافزون انواع مختلف بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف ESBL، به‌ویژه blaTEM و تأثیر متفاوت آنها بر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، تعیین دقیق تیپ‌های مختلف آنزیم‌های ESBL با روش‌های مولکولی مانند PCR از نظر شناخت مقاومت‌های منطقه‌ای بسیار مهم است (۴). ژن کدکننده این آنزیم‌ها از طریق مکانیسم‌های ترانسفورمیشن و ترانسپوزیشن به باکتری‌های دیگر منتقل می‌شوند و میکروارگانیسم‌هایی که حامل این ژن‌اند افزایش چشمگیری در میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را کسب می‌کنند (۵). بین انواع باکتری‌ها، باکتری‌هایی مانند اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا پتانسیل ذاتی برای تخریب حلقه بتالاکتام داروها دارند (۶). در واقع ژن بتالاکتام

TEM یکی از مهم‌ترین ژن‌های بتالاکتام پلاسمیدی در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه است که عامل بیش از ۹۰ درصد مقاومت سویه‌های اشرشیا کلی به داروهای بتالاکتام است و از عوامل مهم ایجاد مقاومت‌های چندگانه دارویی در عفونت‌های بیمارستانی است. براساس برخی تحقیقات، مقاومت باکتریایی در برابر بعضی آنتی‌بیوتیک‌ها مانند سفالوسپورین‌ها و کوتریموکسازول‌ها در حال افزایش است (۶)؛ بنابراین، معرفی و به‌کارگیری روش‌های جدید و روش‌های جایگزین با آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های باکتریایی لازم و ضروری است.

وقتی اندازه ذرات در مواد مختلف در محدوده نانو باشد، آنگاه خواصی که این مواد از خود نشان می‌دهند با خواص آنها در حالت توده‌ای یکسان نیست و خواص بسیار جالب، مطلوب و مفیدتری برای کاربردهای مختلف نشان می‌دهند. محققین مختلف، خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات فلزی را بیان کرده‌اند. نانوذرات می‌توانند بدون اثرات آنتی‌بیوتیکی به باکتری‌های مقاوم نفوذ کنند و با تأثیر بر پروتئین‌ها یا اسیدهای نوکلئیک مقاومت آنها را درهم بشکنند. این نتیجه بارها در مطالعات مختلف در خصوص کنترل مقاومت باکتری‌ها نشان داده شده است (۷،۸،۹،۱۰)؛ بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر نانوذره نقره برای کنترل عفونت ناشی از باکتری مقاوم شده اشرشیا کلی صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به‌صورت توصیفی - مقطعی^۳ و در یک بازه زمانی ۹ ماهه (آبان ماه ۱۳۹۸ تا مرداد ماه ۱۳۹۹) انجام شد و تعداد ۶۴ سویه اشرشیا کلی از ۱۱ آزمایشگاه

(1399) به صورت لیوفیلیزه تهیه شدند. برای این منظور، از باکتری‌های رشد کرده سوسپانسیون معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه و روی محیط مولر هیتون آگار به صورت کشت سفره‌ای کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. پس از آن دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با پنس استریل در سطح محیط قرار گرفتند؛ به طوری که فاصله دیسک‌ها از لبه پلیت ۱/۵ سانتیمتر و نسبت به هم ۲/۵ سانتی‌متر بود. سپس پلیت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از این مدت اطراف دیسک‌ها از لحاظ هاله عدم رشد بررسی شدند و قطر ناحیه اطراف دیسک با خط‌کش مخصوص اندازه‌گیری و با مراجعه به جداول کمیته ملی معیارهای آزمایشگاهی بالینی^۶ حساسیت یا مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها تعیین شد؛ در نهایت، پس از ۲۴ ساعت انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حداقل غلظت بازدارندگی رشد^۷ باکتری تعیین شد.

به منظور بررسی سنجش حساسیت باکتری‌ها در برابر نانوذره نقره از سه روش انتشار چاهک در آگار، انتشار دیسک در آگار و روش ماکرودایلوشن (روش سری رقت در لوله) استفاده شد. برای تهیه سری رقت از نانوذرات از روش رقت‌سازی سریال از نانوذره نقره، سری رقت‌های ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۲۴۰، ۴۸۰، ۹۶۰ ppm تهیه شد.

ساخت نانوذره نقره: ۵ گرم پودر زنجبیل در ۵۰ سی سی آب مقطر، حل (در این روش برای هر گرم پودر گیاه ۱۰ سی سی آب مقطر استریل اضافه می‌شود) و به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. سپس محلول به دست آمده به ویال ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و ۱۲ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول فوقانی به دست آمده از سانتریفیوژ

تشخیص طبی سطح شهر مشهد جمع‌آوری شدند. پس از انتقال سوبه‌ها به آزمایشگاه تحقیقات گروه زیست شناسی واحد مشهد، برای تأیید شناسایی سوبه‌هایی که قبلاً توسط آزمایشگاه‌های تشخیص طبی بررسی شده بودند، از روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی مربوط به خانواده انتروباکتریاسه همانند رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش اکسیداز، کشت روی محیط‌های آزمایشگاهی تریپل شوگر آیرون آگار (TSI)، سیمون سترات آگار، MR/VP، برات (محیط حاوی گلوکز و فسفات استفاده شد و با توجه به نوع باکتری یکی از دو واکنش تخمیر اسیدی مخلوط و تخمیر بوتیلن گلیکول در آن صورت می‌گیرد) و ائوزین متیلن بلو آگار (یک محیط افتراقی برای باکتری‌های گرم منفی و به خصوص *اشرشیا کلی*) استفاده شد. همچنین، محیط کشت SIM آگار به منظور بررسی حرکت باکتری، تولید ایندول و تولید سولفید هیدروژن استفاده شد (۱۱). محیط مولر هیتون برات و محیط مولر هیتون آگار برای تست آنتی‌بیوگرام استفاده شدند. از محیط پایه تریپتون سویا برات^۴ برای فریز کردن استفاده شد.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی: به منظور بررسی مقاومت به بتالاکتام و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی از محیط مولر هیتون آگار و روش انتشار دیسک در آگار استفاده شد (۱۲). دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استفاده شده در این مطالعه شامل کربنی‌سیلین ۱۰۰ μg، پنی‌سیلین ۱۰ μg، ۲۵، آمپی‌سیلین ۱۰ μg، افلوکساسین ۵ μg، استرپتومایسین ۱۰ μg، تتراسایکلین ۳۰ μg، کلرامفنیکل ۳۰ μg، نیتروفورانتوئین ۳۰۰ μg، نورفلوکسازین ۱۰ μg و سیپروفلوکساسین ۵ μg بود. این مرحله براساس دستورالعمل استاندارد آزمایشگاه (۱۳) انجام شد. سوبه‌های استاندارد این باکتری (*اشرشیا کلی* PTCC

شد.

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

PCR ژن blaTEM: پس از طراحی پرایمرها، واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵/۵ میکرولیتر 5X PCR master mix (ایران، سیناکلون) دارای Taq DNA polymerase ۰/۰۵ U/μl، ۳MgCl₂ ۴ mM / ۰/۴ از dNTPs، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۱۰/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل با استفاده از گرادینت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) و با برنامه دمایی، دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای ۳۴ سیکل در شرایط واسرشته شدن ۹۴^۸ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر^۹ ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، طولیل شدن ۷۲^۱ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه انجام شد (۱۲). میزان تغییر بیان ژن با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 و آزمون One way ANOVA تجزیه و تحلیل شد؛ در تمام موارد سطح معنی‌داری $p < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

به یک پلیت، منتقل و در مجاورت شعله فیلتر شد. ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره فیلترشده زنجبیل به ویال ۵۰ میلی‌لیتری، منتقل و با ۱۰ میکرولیتر از محلول نترات نقره ۱ میلی‌مولار مخلوط شد. بعد از تغییر رنگ، محلول در میکروتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری با دور ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی دور ریخته شد و ۲ میلی‌لیتر آب دیونیزه یا آب مقطر به رسوب به دست آمده اضافه و مجدد سانتریفیوژ شد. بعد ۳ بار تکرار این مرحله، رسوب انتهایی در پلیت‌های جداگانه ریخته شد و در محل تاریک قرار گرفت تا خشک و پودر نانوذره آماده شود. برای بررسی خصوصیت فیزیکی نانوذره به دست آمده از روش‌های عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری (دانشگاه فردوسی مشهد)، FTIR (دانشگاه آزاد واحد مشهد) و دستگاه طیف‌سنج پراش پرتو ایکس XRD (دانشگاه فردوسی مشهد) استفاده شد.

استخراج RNA: استخراج RNA بعد از تیماردهی سوسپانسیون باکتری دارای ژن blaTEM با نانوذرات نقره با رقت ۲۴۰ ppm (حداقل غلظت بازدارندگی رشد) انجام شد. استخراج RNA با استفاده از کیت مخصوص (5292) شرکت پارس طوس زیست‌فناور، انجام و پس از آن غلظت و جذب نوری تمامی RNAهای استخراج شده با کمک نانودراپ (Nanodrop Bio Tek Epoch, USA) اندازه‌گیری

جدول ۱- توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای طراحی و استفاده شده در تکثیر ژن blaTEM در ارشیا کلی

| ژن | توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای استفاده شده | درجه (T _m) (سانتی‌گراد) |
|---------|--|--|
| blaTEM | Forward: 5' ACCAGATTCTCCGCCTCTGA 3 Reverse: 5' GGTGGAGCTGACTTCATCCG 3 | ۶۱ |
| 16S RNA | F: CCCAACCCCTTTCCTTACTTGC R: CATCAACTTCACCTTCACGC | ۵۹ |

نتایج

بررسی مورفولوژی کلنی در محیط ائوزین متیلن بلو آگار: تمامی سویه‌هایی که در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، به‌عنوان *اشرشیا کلی* شناسایی شده بودند به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبی‌شناسی انتقال داده شدند و با روش‌های رایج آزمایشگاهی شناسایی سویه‌ها تأیید شد.

نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی: ارزیابی فوتیوی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اشرشیا کلی* مقاوم به بتالاکتام نشان داد ۹۰ درصد به پنی‌سیلین، ۶۶ درصد به کربنی‌سیلین، ۸۷ درصد سویه‌ها به اریترومايسين، ۸۵ درصد به سفوتاکسیم، ۸۴ درصد به سفتریاکسون، ۴۹ درصد به جنتامایسین، ۳۷ درصد به سپیروفلوکسازین، ۲۲ درصد به ایمی‌پنم و ۱۲ درصد به لینزولید مقاومت داشتند؛ یعنی بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب متعلق به پنی‌سیلین ۹۰ درصد، اریترومايسين ۸۷ درصد و کمترین نسبت به ایمی‌پنم ۲۲ درصد و لینزولید ۱۲ درصد بود. همچنین، ۹۰ درصد سویه‌ها به بیش از یک آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند که این نشان‌دهنده مقاومت چنددارویی در این سویه‌ها است.

در این مطالعه، تمامی سویه‌های مقاوم دارای ژن *blaTEM* بودند. شکل ۱ نتیجه محصول PCR ژن *blaTEM* بعد از انجام الکتروفورز است. وجود باند ۸۰۰ جفت‌بازی نشان‌دهنده مثبت‌بودن از نظر وجود ژن *blaTEM* است.

بررسی خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره: فعالیت ضد میکروبی نانوذره نقره تولیدشده از عصاره زنجبیل با مشاهده و اندازه‌گیری هاله عدم رشد باکتری در اطراف دیسک‌های حاوی محلول نانوذرات نقره برای تمامی

سنجش بیان ژن با تکنیک Real-Time PCR: واکنش

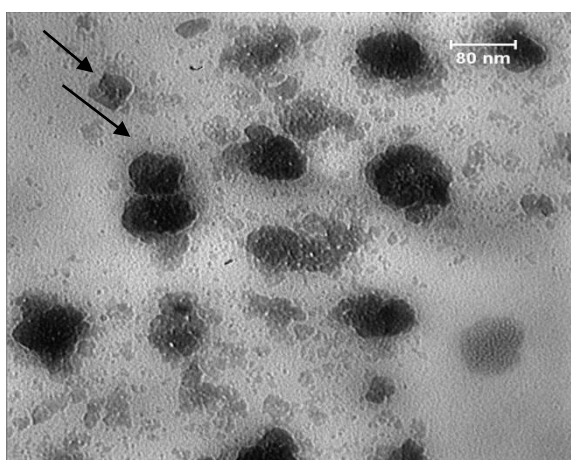
زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت (Genet bio CAT. NO: Q9210) کره جنوبی^{۱۱} به‌صورت زیر انجام شد؛ ۱۰ میکرولیتر از Prime Qmaster mix (2x) with syber green، ۵ میکرولیتر از Depc water، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر از Rox dye و ۲ میکرولیتر از cDNA استفاده شد. تکثیر قطعه‌ای مدنظر در دستگاه Applied Biosystems StepOnePlus با برنامه واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه، تکثیر شامل واسرشت در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. برای محاسبه میزان بیان نسبی ژن، آنالیز داده‌ها و رسم نمودارهای مربوطه از LightCycler Relative Quantification Software استفاده شد. داده‌های مربوط به تعبیر بیان ژن *blaTEM* با روش $2\Delta\Delta CT$ با فرض کارایی ۱۰۰ درصد و با استفاده از آزمون آماری T مستقل در دو گروه آنالیز شد (۱۴).

آشکارسازی محصولات PCR با روش الکتروفورز

ژل آگارز

روش انجام الکتروفورز روی ژل آگارز: برای بررسی نتیجه آزمایشات مختلف، از جمله استخراج DNA و PCR از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. به این منظور، محصول روی ژل آگارز ۱ درصد و در بافر TBE به مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز شد (۱۴). نتایج توسط دستگاه Geldocument با نور UV مشاهده شد.

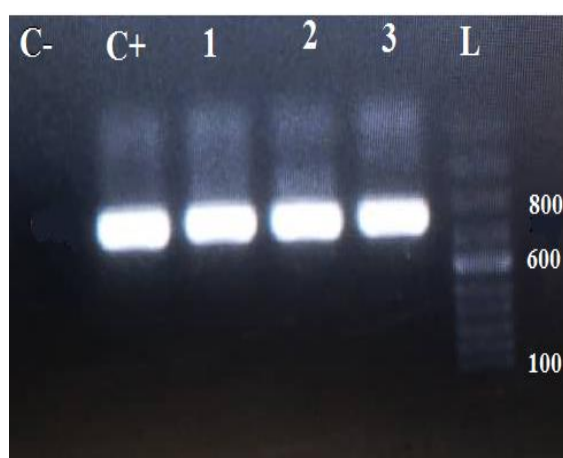
۲۰۲ و ۳۱۱ بوده و به ترتیب مربوط به زاویه‌های $37/5^\circ$ ، $44/3^\circ$ ، $64/9^\circ$ و $78/8^\circ$ بوده است که وجود نانوکریستال‌های نقره را ثابت می‌کند. همچنین نتایج نشان داد بیشتر نانوذرات شکل مکعبی داشتند و ۴ پیک جذب در زاویه بین پرتو تابش و بازتابش، ۳۸، ۴۴، ۶۵ و ۷۷ درجه در آنها تشخیص داده شد (شکل ۳).



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از نانوذرات نقره ساخته شده (پیکان‌ها اشاره به نانوذراتی می‌کنند که جدا قرار گرفته‌اند و با نانوذرات دیگر همپوشانی ندارند)

بیان ژن *blaTEM* بعد از تیمار با مهارکننده نانوذره نقره: برای مقایسه اثر نانوذره نقره بر بیان ژن *blaTEM* بعد از استخراج RNA و سنتز cDNA بیان ژن به صورت کمی با استفاده از روش Real Time PCR بررسی شد. نتایج این روش نشان داد سویه‌های مختلف تحت تأثیر نانوذرات نقره تغییر بیان متفاوتی را داشتند و از نظر آماری کاهش معناداری در مقایسه با بیان ژن در نمونه کنترل را نشان دادند ($P < 0/05$) (شکل ۱).

سویه‌های آزمایش مشاهده شد (اندازه هاله 9 ± 4 میلی‌متر بود)؛ بنابراین، محلول حاوی نانوذرات نقره، فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های آزمایش داشت و هاله قابل تشخیص که حاصل جلوگیری از رشد میکروب توسط نانوذرات نقره است، در تمام تیمارهای اصلی در مقایسه با نمونه‌های شاهد (عصاره، آب مقطر و نیترات نقره) مشاهده شد.

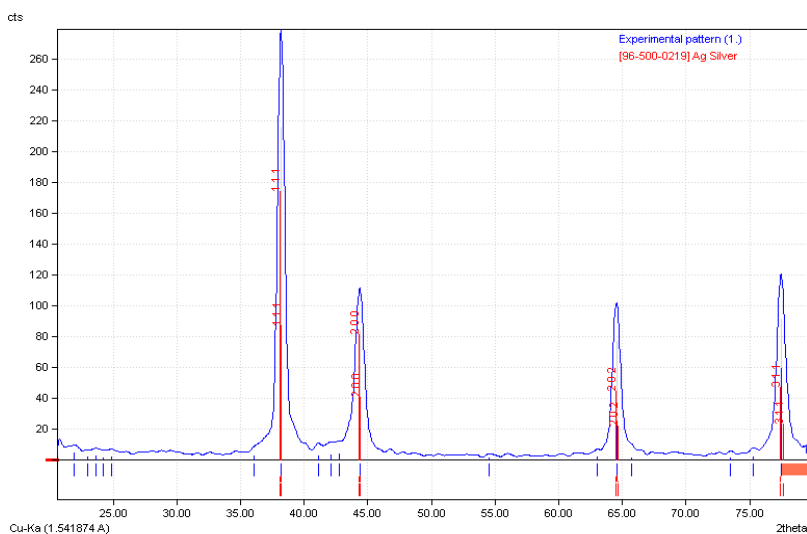


شکل ۱- نتایج الکتروفورز حاصل تکثیر ژن *blaTEM* (از راست به چپ: مارکر ۱۰۰ جفت‌بازی، ۳ سویه حاوی ژن *blaTEM*، کنترل مثبت و کنترل منفی. طول قطعه مدنظر ۸۰۰ جفت‌باز است)

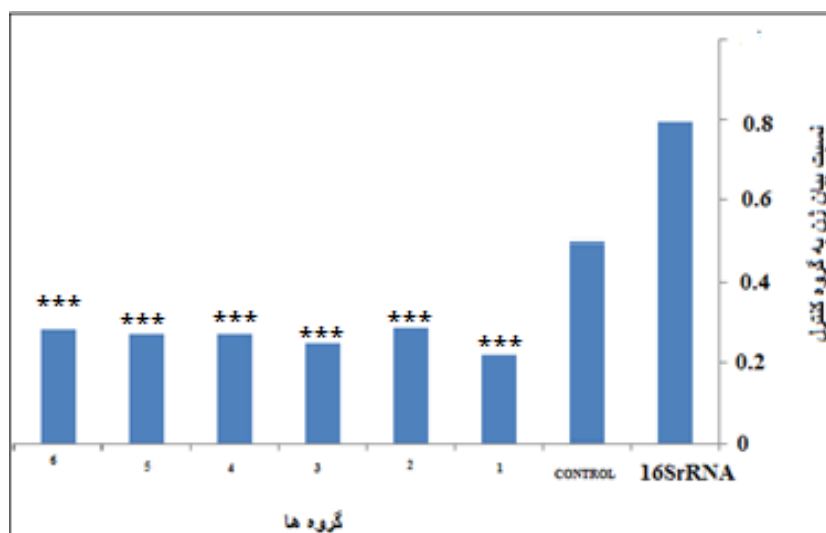
براساس روش ماکرودایلوژن و بررسی اثر نانوذره نقره بر باکتری، میزان MIC ppm ۲۴۰ و MBC ppm ۴۸۰ تعیین شد.

بررسی ریخت‌شناسی نانوذره نقره سنتز شده: بررسی نانوذره نقره با میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد نانوذرات تولیدی اکثراً شکل مکعبی با اندازه $22/39$ تا $93/35$ نانومتر و تعداد بسیار کمی به صورت مثلثی و میله‌ای‌اند (شکل ۲).

مطالعه XRD: براساس شکل ۳ الگوی پراش اشعه ایکس (xrd)، اندیس‌های میلر در سطوح ۱۱۱، ۲۰۰،



شکل ۳- الگوی پراش اشعه ایکس بر نانوذرة 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.



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

بحث و نتیجه گیری

عفونت‌های مجاری ادراری (Urinary tract infections) دومین عفونت شایع انسانی است که توسط خانواده انتروباکتریاسه و به خصوص *اشرشیا کلی* به وجود می‌آید. افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اشرشیا کلی* و بررسی تغییرات الگوی مقاومت

آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اشرشیا کلی* جدا شده از عفونت‌های ادراری بیماران در طی سال‌های گذشته درخور توجه خاص بوده است (۱۴). گزارش مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اشرشیا کلی* و مطالعه تغییرات الگوهای این مقاومت در ایران نیز درخور توجه بوده است. معینی و امینی در سال ۱۳۹۵ نشان دادند

است. حساسیت نسبت به ایمنی پنم در سایر مطالعات انجام‌شده در ایران و سایر نقاط جهان نیز گزارش شده است (۲۱). لازم به توضیح است اختلافات مشاهده‌شده در نتایج تحقیقات مختلف می‌تواند مربوط به تفاوت در الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک، منطقه جغرافیایی، تفاوت در الگوی مقاومت در مناطق مختلف، روش‌های مختلف آنتی‌بیوگرام و مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک در کشورها است (۲۴).

مکانیسم‌های عامل مقاومت باکتریایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها متفاوت بوده و یکی از مهم‌ترین آنها تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز توسط باکتری‌هاست که عامل مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام است. این آنزیم‌ها از طریق هیدرولیز هسته مرکزی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام باعث از بین رفتن اثرات آنها و غیرفعال شدن آنها می‌شوند. متالوبتالاکتامازها، از جمله آنزیم‌های بتالاکتامازی‌اند که توسط برخی باکتری‌های مقاوم، ترشح و باعث مقاومت به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌شوند. این آنزیم‌ها به‌طور وسیعی در میان باکتری‌ها توزیع شده‌اند و نقش اصلی را در مقاومت ذاتی و اکتسابی باکتری‌ها ایفا می‌کنند. متالوبتالاکتامازها طیف سوبسترای وسیعی دارند و قادر به هیدرولیز تمام بتالاکتام‌ها به‌جز منوباکتام‌ها هستند. این آنزیم‌ها داخل اینتگرون قرار گرفته‌اند و می‌توانند در پلاسمید یا کروموزوم ادغام شوند؛ بنابراین، قابلیت انتقال در انتروباکتریاسه‌ها را دارند (۲۵). حدادی و فلاح در سال ۱۳۹۶ بیان کردند بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، گروهی از آنزیم‌ها با توانایی هیدرولیز سفالوسپورین‌ها و آزترونام‌اند و انواع مختلفی از بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) از قبیل blaTEM و blaSHV به‌طور گسترده در سویه‌های *اشریشیا کلی*

وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به *اشریشیا کلی* در کودکان مبتلا به اسهال بسیار بالا است و جامعه شاهد سویه‌های مقاوم این باکتری‌ها است (۱۵). همچنین در سال ۱۳۹۰ مهاجری و همکاران مقاومت ۷۷ درصدی باکتری *اشریشیا کلی* را برای آمپی‌سیلین گزارش کردند (۱۶) و میرصالحیان و همکاران مقاومت ۹۸/۵ درصدی را بین این نمونه‌ها مشاهده کرده بودند (۱۷). این گزارشات مشابه گزارشی‌اند که در این خصوص در کشورهای دیگر نیز ارائه شده است (۱۸)؛ برای مثال، سال ۲۰۱۱ در پژوهش لی و همکاران، مقاومت ۶۰ درصدی نسبت به آمپی‌سیلین مشاهده شد (۱۹) یا مطالعه‌ای در همین سال مربوط به کشور یونان نشان‌دهنده مقاومت ۵۰ درصدی نسبت به آمپی‌سیلین است (۲۰). این روند افزایشی مقاومت در سایر آنتی‌بیوتیک‌ها نیز مشاهده شده است. در مطالعه مانتاداکیس در سال ۲۰۰۵ مقاومت *اشریشیا کلی* نسبت به سفوتاکسیم ۳/۷ درصد بود (۲۱). در مطالعه سال ۲۰۱۱ کیفر و همکاران در برزیل، نرخ سویه‌های مقاوم *اشریشیا کلی* به سفوتاکسیم ۱۴/۶ درصد گزارش شده است (۲۲). در این مطالعه فراوانی مقاومت سویه‌های *اشریشیا کلی* نسبت به سفوتاکسیم ۸۴ درصد بود که نسبت به نتایج سال ۲۰۱۱ مهاجری و همکارانش که ۲۷ درصد را مشاهده کرده بودند (۱۶)، افزایش چشمگیر نشان می‌دهد و این تفاوت گویای افزایش مقاومت به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف طی سال‌های اخیر است و می‌تواند به‌عنوان یک هشدار در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری باشد (۲۳). مقاومت به سیپروفلوکساسین در این مطالعه در ۲۲ درصد سویه‌ها مشاهده شد. همچنین در این پژوهش، مقاومت به آنتی‌بیوتیک ایمنی پنم نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار کم بوده

قبلاً نیز گزارش شده بود (۲۸). در مطالعه حاضر، ۹۰ درصد سویه‌ها به بیش از دو آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند. آمار شیوع *اشرشیا کلی* مولد ESBL در ایران متفاوت بوده و بیشترین آمار (۶۸ درصد) از کرمان گزارش شده است (۲۹). نتیجه مطالعات جمیل و همکارانش نشان‌دهنده شیوع ۳۳ درصدی ESBL در باکتری‌های *اشرشیا کلی* در افراد مبتلا به عفونت مجاری ادراری است (۳۰). مشابه این نتایج در کشورهای دیگر نیز گزارش شده است. در مطالعه ملزر و همکاران ۶۰/۸ درصد باکتری‌های منجر به مرگ، ناشی از *اشرشیا کلی* تولیدکننده ESBL بوده است (۳۱). در تحقیقات متعددی، فراوانی‌هایی مانند ۶۰/۶، ۲۱ و ۴۴/۳ درصد شیوع ESBL نیز گزارش شده است (۳۲). بالی و همکاران در ترکیه فراوانی ESBL در ایزوله‌های *اشرشیا کلی* را ۶۹/۱۴ درصد گزارش کردند (۳۳). فراوانی ESBL در جوامع مختلف متفاوت است. در برخی از آنها میزان آن کمتر از نتایج این مطالعه است (۳۴). نتایج برخی تحقیقات نشان داده است سویه‌های دارای ESBL در حال افزایش‌اند (۳۵). در مطالعه حسینی مزینانی و همکاران و استانگ و همکارانش به ترتیب ۶۰ درصد و ۶۷ درصد سویه‌های *اشرشیا کلی* حاوی ژن *blaTEM* بودند (۳۶) و ژن *blaCTX-M* در ۵۵ درصد سویه‌ها وجود داشته است (۳۷) که با نتایج کالبو و همکارانش در اسپانیا مطابقت دارد (۳۸). در مطالعه بالی و همکاران میزان رونویسی این ژن در میان سویه‌های *اشرشیا کلی* کمی بیشتر بوده است (۷۲ درصد) (۳۹). در مطالعه حاضر تمام سویه‌ها دارای ژن *blaTEM* بودند؛ بنابراین با توجه به نتایج، مقاومت به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف و دیگر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه بالاست. علاوه بر این، میزان شیوع ESBL و ژن *TEM* نیز آمار بالایی

حضور دارند. آنها میزان بالای مقاومت سویه‌های واجد ژن‌های *blaTEM* و *blaSHV* به سفالوسپورین‌های نسل سوم را گزارش کردند که تولیدکننده بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف‌اند (۲۶). شعبانی لکرانی و همکاران در سال ۱۳۹۳ میزان فراوانی ژن‌های *blaTEM*، *blaSHV* و *blaCTX-M* مولد بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف در ایزوله‌های *اشرشیا کلی* جمع‌آوری شده از آب‌های زیرزمینی استان آذربایجان شرقی را بررسی کردند. نتایج فنوتیپی حاصل از این مطالعه نشان داد تنها ۲ (۹ درصد) ایزوله دارای مقاومت از نوع ESBL بودند؛ در حالی که در بررسی ژنوتیپی تعداد ۹ ایزوله (۳۹ درصد) دارای ژن *blaTEM*، ۱۰ ایزوله (۴۳ درصد) حاوی ژن *blaSHV* و ۱۴ ایزوله (۶۱ درصد) حاوی ژن *blaCTX-M* در ژنوم خود بودند. نتایج حاصل از این مطالعه درصد بالای مقاومت بتالاکتام‌های را بین سویه‌های *اشرشیا کلی* جداشده از منابع آبی زیرزمینی نشان می‌دهد (۲۷). حدادی و یکه فلاح در سال ۱۳۹۶ فراوانی ژن‌های *blaTEM* و *blaSHV* در سویه‌های *اشرشیا کلی* مولد بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف جمع‌آوری شده از شهر کرج را بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد ۴۲/۸ درصد ایزوله‌ها مولد بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف بودند که از این تعداد ۶۰/۷۸ درصد و ۳۹/۲۱ درصد به ترتیب دارای ژن‌های *blaTEM* و *blaSHV* و ۹/۳۲ درصد دارای هر دو ژن بودند و گفتند میزان بالای مقاومت سویه‌های واجد ژن‌های *blaTEM* و *blaSHV* *اشرشیا کلی*‌های تولیدکننده بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف باید محدود شود (۲۶). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد تقریباً تمام باکتری‌های مورد مطالعه، ژن *blaTEM* و مقاومت به چند آنتی‌بیوتیک را دارند؛ این نتیجه باعث نگرانی درباره کنترل عفونت ناشی از این باکتری می‌شود که

دارای فسفر، نظیر DNA کارآیی آنها را از بین ببرند (۴۱). در سال‌های اخیر، استفاده از نانوذرات فلزی به‌عنوان ترکیبات ضدباکتری روند روبه‌رشدی داشته است. از این میان نانوذرات نقره (۴۲)، اکسیدهای تیتانیوم (۴۳)، روی (۴۴،۴۵)، مس (۴۶) و آهن (۴۷،۴۸) به‌دلیل خواص ضدباکتری مناسب، بیش از سایر نانوذرات استفاده شده‌اند. غلامی شعبانی در سال ۱۳۹۱ نشان داد اندازه نانوذرات نقره هر چقدر کوچک‌تر باشد، اثر ضد میکروبی آن بیشتر می‌شود. این مطالعه نشان داد خواص آنتی‌باکتریال سطوح پوشیده با کلونید نانوذرات نقره سنتز شده به کمک قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم به‌دلیل کوچک‌تر بودن اندازه نانوذرات نسبت به کلونید حاصل از باکتری *اشریشیا کلی* مطلوب‌تر است (۴۹). سلمانی و همکاران در سال ۱۳۹۶ فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره علیه دو باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* و دو باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سرئوس* را بررسی کردند. براساس نتایج حاصل از این مطالعه باکتری‌های *اشریشیا کلی* کمترین حساسیت و باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین حساسیت را نسبت به نانوذرات نقره نشان دادند (۵۰). مطالعه رشید و همکارانش در سال ۱۳۹۹ نشان داد نانوذرات نقره نقش مهارکننده روی بیان ژن *mecA* در نمونه‌های مقاوم به متی‌سیلین باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارند (۵۱). مطالعه حاضر نیز اثر ضد میکروبی نانوذره نقره روی سویه‌های *اشریشیا کلی* را تأیید می‌کند؛ بنابراین، می‌توان به این گزینه فکر کرد که ممکن است نانوذرات بتوانند به‌عنوان مواد ضد میکروبی در محیط‌های درمانی استفاده شوند. اسدی و همکارانش در سال ۱۳۹۲ نشان دادند متغیرهایی نوع باکتری، زمان

دارد. پیامد این مسئله، طولانی شدن دوره بیماری و مدت بستری، افزایش هزینه‌های درمانی و تجویز آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف است؛ بنابراین، تجویز سفالوسپورین‌ها و فلوروکینولون‌ها باید با احتیاط بیشتری صورت گیرد. با توجه به حساسیت بیشتر سویه‌های مورد مطالعه به ای‌می‌پنم و ارزشمند بودن این دارو، نتیجه می‌گیریم در درمان عفونت باکتریال، با کمک متخصصین آزمایشگاه و به دنبال تعیین الگوی حساسیت دقیق، از یک بتالاکتام در ترکیب با یک بازدارنده بتالاکتام‌ها استفاده شود. با این روش از گسترش بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف بین سویه‌های مختلف باکتریایی، کاسته و از گسترش عفونت‌های مقاوم و نیز روزافزون شدن مرگ‌ومیر در مراکز درمانی پیشگیری می‌شود. تولید ESBL تهدیدی بزرگ برای مصرف سفالوسپورین با طیف وسیع به شمار می‌رود؛ بنابراین، برای درمان عفونت‌هایی که مشکوک به ارگانسیم‌های تولیدکننده ESBL هستند، باید آنتی‌بیوتیکی مناسب و با دقت زیاد انتخاب شود. سویه‌هایی که حساسیت آنها در برابر سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفتریاکسون کاهش یافته است باید از نظر دارا بودن ژن‌های ESBL بررسی شوند.

یکی از راه‌های امیدوارکننده برای از بین بردن مقاومت‌های باکتریایی، استفاده از نانوذرات فلزی است (۴۰). نانوذرات به‌دلیل اندازه کوچک و سطح تماس بالایی که با محیط و میکروارگانیسم‌ها دارند می‌توانند افزایش فعالیت بیولوژیک و شیمیایی آنها را باعث شوند. همین امر موجب می‌شود اثرات ضد میکروبی نانوذرات فلزی در مقایسه با خود فلزات بسیار بالاتر باشد. آنها می‌توانند پس از ورود به سلول باکتریایی با تداخل در عملکرد پروتئین‌های حاوی سولفور و مولکول‌های

- (5) Angulo P, Lindor K. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol Clin.* 2002; 17 (3): 186-190.
- (6) Duran N, Marcato PD, Alves OL, Desouza GIH, Esposito E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J Nanobiotechnol* 2005; 3: 1-7. doi: 10.1186/1477-3155-3-8
- (7) Ibanez J, Litter MI, Pizarro RA. Photocatalytic bactericidal of Tio 2 on *Enterobacter cloacae* comparative study with other gram negative bacteria. *J Photochem Photobiol.* 2003; 157 (2): 81-05.
- (8) Lara HH, Ayalanunez NV, Ixtepanturrent C, Rodriguez C. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010; 26 (1): 615-21.
- (9) Andrade SS, Sader HS, Jones RN, Pereira AS, Pignatari ACC, Gales, AC. Increased resistance to first-line agents among bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Latin America: time for local guidelines ?. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2006; 101 (7): 741-748.
- (10) Balasubramanian S, Kuppaswamy D, Padmanabhan S, Chandramohan V, Amperayani S. Extended-spectrum beta-lactamase-producing community-acquired urinary tract infections in children: Chart review of risk factors. *Journal of Global Infectious Diseases.* 2018; 10 (4): 222-225.
- (11) Nimmo GR, Coombs GW, Pearson JC, O'Brien FG, Christianser K, Turnidge JD, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Australian community: an evolving epidemic. *Medical journal of Australia.* 2006; 184 (8): 384-399.
- (12) Wayne PA. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2011.
- (13) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 13th edition. Available at: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m02/>. 2014.

تماس و غلظت نانوذرات نقره عوامل مؤثر بر بروز خاصیت ضد میکروبی نانوذرات نقره است و باکتری اشرشیا کلی نسبت به استافیلوکوکوس اورئوس در مقابل نانوذرات نقره سنتز شده به روش احیای الکتروشیمیایی مقاومت بیشتری نشان داد (۵۲).

سیاسگزاری

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

References

- (1) Salyers AA, Whitt DD. *Bacterial pathogenesis. A molecular approach.* 2nd ed. Washington, DC: ASM Press; 2002.
- (2) Welinder-Olsson C, Kaijser B. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Scandinavian journal of infectious diseases.* 2005; 37 (6-7): 405-16.
- (3) Ganguly NK, Arora NK, Chandy SJ, Fairoze MN, Gill JP, Gupta U, et al. Rationalizing antibiotic use to limit antibiotic resistance in India. *Indian J Med Res.* 2011; 134 (3): 281-94.
- (4) Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, Sonnenborn U, Gottschalk G, Hacker J, et al. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* 2004; 186 (16): 5432-41.

- (14) Nourbakhsh F, Nourbakhsh H. Detection of antibiotic resistance patterns in *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients admitted to Isfahan hospitals during 2014-2015. *KAUMS Journal (FEYZ)*. 2015; 19 (4): 356-63.
- (15) Moeeni S, Amini K. Evaluation of ESBL genes of *blaTEM*, *blaSHV*, *blaOXA* and aminoglycoside gene of *aadA* in *Escherichia coli* strains isolated in Tehran and determination of antimicrobial resistance. *MEDICAL SCIENCES*. 2016; 26 (2): 76-81.
- (16) Mohajeri P, Izadi B, Rezaei M, Fallahi B, Khademi, H, Ebrahimi R. Investigation of broad-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections and the pattern of antibiotic resistance in Kermanshah. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*. 2011; 1 (11): 86-94.
- (17) Mirsalehian A, Akbari-Nakhjavani A, Peymani A, Kazemi B, JabalAmeli F, Mirafshar SM. Prevalence of extended spectrum B-lactamase-producing enterobacteriaceae by phenotypic and Genotypic Methods in Intensive Care Units in Tehran, Iran. *Daru-Journal of Pharmaceutical Science*. 2008; 16 (3): 169-173.
- (18) Daza R, Gutierrez J, Piedrola G. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections. *International journal of antimicrobial agents*. 2001; 18 (3): 211-215.
- (19) Lee SJ, Lee DS, Choe HS, Shim BS, Kim CS, Kim ME, Cho YH. Antimicrobial resistance in community-acquired urinary tract infections: results from the Korean Antimicrobial Resistance Monitoring System. *Journal of infection and chemotherapy*. 2011; 17 (3): 440-446.
- (20) Mantadakis E, Tsalkidis A, Panopoulou M, Pagkalis S, Tripsianis G, Falagas M, et al. Antimicrobial susceptibility of pediatric uropathogens in Thrace, Greece. *International urology and nephrology*. 2011; 43 (2): 549-55.
- (21) Mantadakis E, Tsalkidis A, Panopoulou, M, Pagkalis, S, Tripsianis, G, Falagas, M, Chatzimichael, A. 2011. Antimicrobial susceptibility of pediatric uropathogens in Thrace, Greece. *International urology and nephrology*, 43(2): 549-55.
- (22) Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C, Sampaio J, Sakagami E, Turner P, et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2005; 9 (3): 216-224.
- (23) Mirsalehian A, Akbari-Nakhjavani A, Peymani A, Kazemi B, JabalAmeli F, Mirafshar SM. Prevalence of extended spectrum B-lactamase-producing enterobacteriaceae by phenotypic and Genotypic Methods in Intensive Care Units in Tehran, Iran. *Daru-Journal of Pharmaceutical Science*. 2008; 16 (3): 169-173.
- (24) Guest JF, Morris, A. Community-acquired pneumonia: the annual cost to the National Health Service in the UK. *European Respiratory Journal*. 1997; 10 (7): 1530-1534.
- (25) Van Gorkom HJ, Pulles MP, Wessels JS. Light-induced changes of absorbance and electron spin resonance in small Photosystem II particles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1975; 408 (3): 331-339.
- (26) Haddadi A, Yekefallah F. Frequency determination of *BLATEM* & *BLASHV* in the extended-spectrum beta-lactamase producing *E. coli* isolated from Karaj. *Iranian journal of medical microbiology*. 2017; 11 (2): 75-80.
- (27) Shabani Lokarani N, Shayegh J, Sadeghi J. Frequency of *BLATEM*, *BLASHV*, and *BLACTX-M* genes extended-spectrum BETA-Lactamase in *E. coli* isolated collected from groundwater in east Azarbaijan province in 2014. *Medical journal of Tabriz university of medical science*. 2018; 40 (2): 58-63.

- (28) Lara HH, Ayalanunez NV, Ixtepanurrent C, Rodriguez C. Bactericidal effect of silver nanoparticles gainst multidrug resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010; 26 (4): 615-21.
- (29) Kalantar D, Mansouri Sh. Emergence of multiple β -lactamases produced by *Escherichia coli* clinical isolates from hospitalized patient in Kerman, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology.* 2010; 3 (4): 137-145.
- (30) Jamil J, Haroon M, Sultan A, Khan MA, Gul N. Prevalence, antibiotic sensitivity and phenotypic screening of esbl/mbi producer *E. Coli* strains isolated from urine; district swabi, kp, pakistan. *Journal of the Pakistan medical association.* 2018; 68 (11): 1704-07.
- (31) Melzer M, Petersen I. Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *The Journal of infection.* 2007; 55(3): 254-259.
- (32) Mirzaee M, Owlia P, Mansouri S. Distribution of CTX-M β -lactamase Genes Among *Escherichia coli* Strains Isolated from Patients in Iran. *Laboratory Medicine.* 2009; 40 (12): 724-727.
- (33) Bali EB, Acik L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum-lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital. *African Journal of Microbiology Research.* 2010; 4 (8): 650-654.
- (34) Saurina G, Quale JM, Manikal VM, Oydna E, Landman D. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brooklyn, NY: epidemiology and relation to antibiotic usage patterns. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2000; 45 (6): 895-898.
- (35) Qi C, Pilla V, Yu JH, Reed K. Changing prevalence of *Escherichia coli* with CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in outpatient urinary *E. coli* between 2003 and 2008. *Diagnostic microbiology and infectious disease.* 2010; 67 (1): 87-91.
- (36) Stange C, Yin D, Xu T, Guo X, Schafer C, Tiehm A. Distribution of clinically relevant antibiotic resistance genes in Lake Tai, China. *The Science of the total environment.* 2019; 655 (10): 337-346.
- (37) Kharrat M, Chebbi Y, Ben Tanfous F, Lakhal A, Ladeb S, Othmen TB, et al. Extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae infections in hematopoietic stem cell transplant recipients: Epidemiology and molecular characterization. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2018; 52 (6): 886-892.
- (38) Calbo E, Romani V, Xercavins M, Gomez L, Vidal CG, Quintana S, et al. Risk factors for community-onset urinary tract infections due to *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2006; 57 (4): 780-783.
- (39) Bali EB, Acik L, Sultan N. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum-lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital. *African Journal of Microbiology Research.* 2010; 4 (8): 650-654.
- (40) Kim J, Kuk E, Yu K, et al. Nanomedicine: Nanotechnology. *Biology and Medicine.* 2007; 3 (1): 95-101.
- (41) Gordon O, Slenters TV, Brunetto PS, et al. Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2010; 54 (10): 4208-18.
- (42) Besinis A, Peralta T, Handy RD. The antibacterial effects of silver, titanium dioxide and silica dioxide nanoparticles compared to the dental disinfectant chlorhexidine on *Streptococcus mutans* using a suite of bioassays. *Nanotoxicology.*

- 2014; 8 (1): 1-16.
- (43) Stoyanova A, Hitkova H, Bachvarova-Nedelcheva A, et al. Freeze-drying synthesis and characterisation of Na composites of ZnO, TiO₂ and ZnTiO₃ semiconductor oxides. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*. 2013; 48 (1): 154-161.
- (44) Akbar A, Anal AK. Prevalence and antibiogram study of Salmonella and Staphylococcus aureus in poultry meat. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2014; 38 (2): 88-95.
- (45) Xie Y, He Y, Irwin PL, Jin T, Shi, X. Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Applied and environmental microbiology*. 2011; 77 (7): 2325-31.
- (46) Sutradhar P, Saha M, Maiti D. Microwave synthesis of copper oxide nanoparticles using tea leaf and coffee powder extracts and its antibacterial activity. *Journal of Nanostructure in Chemistry*. 2014; 86 (4): 1-6.
- (47) Gholami A, Mohkam M, Rasoul-amini S, Ghasemi, Y. Industrial production of polyhydroxyalcanoates by bacteria: opportunities and challenges. *Minerva Biotecnologica*. 2016; 28 (1): 59-74.
- (48) Ebrahiminezhad A, Davaran S, Rasoul-Amini S, Barar J, Moghadam M, Ghasemi Y. Synthesis, Characterization and Anti-*Listeria monocytogenes* Effect of Amino Acid Coated Magnetite Nanoparticles. *Current Nanoscience*. 2012; 8 (6): 868-874.
- (49) Gholami-Shabani MH, Imani A, Chamani M, Razzaghi-Abyaneh M, Riazi GH, Chian M, et al. Evaluation of the Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles synthesized with *Fusarium Oxysporum* and *Escherichia coli*. *NCMBJ*. 2012; 2 (6): 27-33
- (50) Salmani M. Survey of Silver Nanoparticles Antibacterial Activity Against Gram-Positive and Gram-negative Bacteria in Vitro. *Tolooebehdasht*. 2017; 16 (1): 74-84.
- (51) Rashid A, Molavi F, Mahmoudzadeh H. The effect of silver nanoparticles on *mecA* gene expression in methicillin-resistant samples of *Staphylococcus aureus*. *NCMBJ*. 2020; 11 (41): 0.
- (52) 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*. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*. 2014; 8 (4): 83-92.

¹- *Escherichia coli*

²- Urinary Tract Infections

³- sectional-Cross

⁴- TSB Tryptone Soy Broth

⁵- Antibiotic Zone Scale ruler

⁶- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)

⁷- Minimum Inhibitory of Concentration: MIC

⁸- Denaturation

⁹- Annealing

¹⁰- Extension

¹¹ Genet bio CAT. NO: Q9210