JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره هشتم، شماره اول، ۱۳۹۱، پیاپی ۲۴: ۶۷-۵۷

مطالعه اثر نانوذرات نقره و آنتی بیوتیک‌های موثر بر جدار بطور مجزا و توام بر *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های جدا شده از موارد ورم پستان گاو

جلال کاظمی[۱]، ملاحت احمدی[۲*]، حبیب دستمالچی ساعی[۲]، مسعود ادیب حسامی[۳]

۱- دانش‌آموخته دوره کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- بخش میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- دستیار دوره تخصصی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۱ مهر ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: ۲۰ آذر ۱۳۹۱

چکیده

مقاومت آنتی بیوتیکی در گونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مثل مقاومت نسبت به بتالاکتام‌ها مشخص شده است. موضوع مقاومت دارویی در درمان تورم پستان استافیلوکوکی و احتمال انتقال این مقاومت به انسان وجود دارد. نیاز به استفاده از تکنولوژی مدرن و استفاده از نانوذرات نقره که خاصیت درمانی آن از قبل به اثبات رسیده است، لازم و ضروری به نظر می‌رسد. در طی این بررسی تعداد ۳۱۱ نمونه شیر اخذ گردید. در کارتیه‌های آلوده برای تورم پستان بالینی و همچنین فقدان علائم بالینی، تست کالیفرنیایی تورم پستان (CMT) و کشت باکتری‌شناسی مثبت در مورد اورام پستان تحت بالینی مشخص گردیدند. جهت شناسایی دقیق جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس علاوه بر آزمایشات بیوشیمیایی استاندارد از تکثیر ژن nuc به روش PCR نیز استفاده گردید. حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی نانوذرات نقره و آنتی بیوتیک‌ها بصورت مجزا و توام تعیین شدند. الگوی مقاومت ۵۰ جدایه‌ی استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به پنی سیلین، آموکسی سیلین، آمپی سیلین و سفازولین به ترتیب ۵۰٪، ۵۶٪، ۴۶ ٪ و ۳۰٪ بودند. از کلیه جدایه‌ها، ۸ ٪ نسبت به کمترین میزان نانوذرات نقره حساس بودند. براساس این مطالعه نانوذرات نقره به همراه آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام دارای قدرت اثر بیشتری نسبت به هر کدام از آنتی بیوتیک‌ها و نانوذرات نقره به تنهایی است.

کلمات کلیدی: *مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها، استافیلوکوکوس اورئوس، آنتی بیوتیک‌های موثر بر دیواره سلولی، ورم پستان، نانوذرات نقره*

* نویسنده مسئول: ملاحت احمدی

آدرس: دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. تلفن: ۰۴۴۱۲۹۷۲۶۴۹

پست الکترونیک: *m.ahmadi@urmia.ac.ir*

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری بیماری‌زا می‌باشد که هم در انسان و هم در حیوانات موجب بیماری‌های عفونی متعددی می‌گردد. این باکتری در گاو معمول‌ترین عامل تورم پستان واگیر می‌باشد (۲۶). ورم پستان در گاو اغلب مزمن بوده و با درمان آنتی بیوتیکی به آسانی درمان نمی‌شود لذا مشکلات جدی برای تولید شیر و صنعت لبنیات ایجاد می‌نماید (۲۶). تورم پستان بیماری عفونی است که در بخش تولید با هزینه‌های بالای مالی درمان می‌شود. مقاومت دارویی در گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مثل مقاومت نسبت به بتالاکتام‌ها از جمله متی‌سیلین شناسایی شده است (۱۶). مقاومت‌های چندگانه دارویی نیز گزارش شده است (۱۲-۱۵). این مقاومت‌ها در میان جدایه‌های انسان و دام قابل انتقال بوده (۱۳)، و در پزشکی و دامپزشکی در باکتری‌ها رو به افزایش است (۱). نانوذرات نقره، ذراتی با اندازه ۱ تا ۱۰۰ نانومتر هستند که استفاده از آنها در مقابله با عفونت‌ها روز به روز در حال افزایش است به طوری که نانوذرات نقره امروزه به طور وسیعی در پزشکی جهت مقابله با میکروب‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲). فعال کردن آنتی بیوتیک‌ها با نقره از مدت‌ها قبل شناخته شده است (۲۴). همچنین گزارش شده که در آزادسازی زنجیره تنفسی، از فسفوریلاسیون اکسیداتیو و کلاپس نیروی محرکه پروتون در غشاء سیتوپلاسمی نقش دارد (۹). مکانیسم اثر نانوذرات نقره ممکن است در نتیجه فعالیت آن بر اساس تغییر مورفولوژی و ساختار سلول باکتری باشد و نسبت به سایر مواد ضد میکروبی، سطح تماس بیشتری را با باکتری بوجود می‌آورد (۱۹). استفاده از غلظت‌های پایین نقره در سلول‌های انسانی غیرسمی بودن آن را به اثبات رسانده است (۱۷) و مکانیسم اثر آن طبق گزارشات بدین صورت است که یون نقره با گروه تیول پروتئین باند شده و بر همانندسازی DNA اثر دارد (۱۴). در نتیجه افزایش باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌های کلاسیک، مطالعه و بررسی آنتی بیوتیک‌های فعال شده با نانوذرات نقره نیز افزایش پیدا کرده است (۲۰).

به لحاظ اهمیت مقاومت دارویی در درمان تورم پستان استافیلوکوکی و زیان‌های وارده و احتمال انتقال این مقاومت به انسان نیاز به استفاده از تکنولوژی مدرن و استفاده از نانوذرات نقره که خاصیت درمانی آن از قبل به اثبات رسیده است، لازم و ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

شناسایی و کشت *استافیلوکوکوس اورئوس*

در طی این بررسی تعداد ۳۱۱ نمونه شیر از جمعیت گاوهای شهرهای تبریز و ارومیه اخذ گردید. برای نمونه‌برداری شیر از دام‌ها، ابتدا ناحیه‌ی پستان از طریق ملامسه و مشاهده، وجود لخته در شیر، و علائم التهاب در کارتیه‌های آلوده برای تورم پستان بالینی و همچنین فقدان علائم بالینی، تست کالیفرنیایی تورم پستان (CMT) و کشت باکتری‌شناسی مثبت در مورد اورام پستان تحت بالینی مشخص گردیدند. برای نمونه‌برداری، سر پستان‌ها کاملا شسته شده و توسط الکل ۷۰٪ با استفاده از پنبه استریل ضدعفونی گردیده و با حوله استریل یک بار مصرف خشک می‌شدند. سه دوشش ابتدایی از سر پستانک دور ریخته شده و سپس مقدار ۱۰ میلی لیتر شیر از کاریته‌های درگیر در لوله-های استریل جمع‌آوری گردید و هر کدام به عنوان یک نمونه تلقی گردید. نمونه‌های مذکور تا زمان انجام آزمایشات باکتری‌شناسی در دمای ۲۰- درجه

سانتی‌گراد نگهداری شدند(۷). مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از قسمت میانی لوله‌های حاوی نمونه شیر پس از مخلوط کردن کامل بر روی محیط مانیتول سالت آگار به منظور جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس* کشت داده شد. کلنی‌های زرد رنگ روی محیط کشت پس از رنگ‌آمیزی گرم و مشخص شدن کوکسی بودن کلنی‌ها، بر روی محیط آگار خون دار حاوی ۵٪ خون گوسفند به شکل ایزوله کشت داده شدند. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته کوکسی‌های گرم مثبت از لحاظ ظاهر کلنی، مرفولوژی، آزمایشات کواگولاز و کاتالاز، تخمیر قندها و احیاء نیترات مورد بررسی و شناسایی قرار گرفتند. تست کواگولاز با استفاده از پلاسمای سیتراته گاوی انجام شد (۴). جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت* بدست آمده تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در محیط تریپتیک سوی براث حاوی ۱۵ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA و تشخیص مولکولی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از تکثیر ژن *nuc*

به منظور استخراج DNA از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط BHI و از کیت استخراج DNA ژنومی (Fermantas, Germany) استفاده گردید. جهت شناسایی دقیق‌تر جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* علاوه بر آزمایشات بیوشیمیایی استاندارد از تکثیر ژن *nuc* به روش PCR نیز استفاده گردید (۲۵). بدنبال فرآهم نمودن شرایط لازم جهت تکثیر ژن *nuc* ، واکنش در دستگاه ترموسایکلر (CORBETT, Australia) انجام گرفت. تکثیر ژن *nuc* با استفاده از جفت پرایمر F و R (5'-GCGATTGATGGTGATACGGGT-3') (5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3') انجام پذیرفت. تولید فرآورده با طول تقریبی ۲۷۹ جفت مورد انتظار بود. واکنش PCR با استفاده از کیت PCR ساخت شرکت سیناژن (CinnaGen PCR master kit) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس با غلظت 2X، ۰/۴ میکرومولار از هر یک از پرایمرها و ۲ میکرولیتر از نمونه DNA انجام گرفت. حجم این مخلوط با استفاده از آب مقطر دو بار تقطیر دیونیزه به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. جهت کنترل منفی به جای DNA از آب مقطر استریل استفاده گردید و از DNA استخراج شده از *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 29213) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. تکثیر DNA با الگوی دمایی شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه دمایی هر کدام شامل مرحله دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، و مرحله امتداد در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه انجام گرفت. مرحله نهایی جهت کامل شدن واکنش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳/۵ دقیقه انجام گرفت. یک فرآورده PCR تنها با یک اندازه از همه جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بدست آمد. اندازه فرآورده PCR با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۲٪ با استفاده از مارکر GeneRuler^{TM} 100 bp DNA ladder (Frementas, Germany) مشخص گردید. از تعداد ۳۱۱ نمونه مورد آزمایش ۵۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* با آزمایشات بیوشیمیایی و تشخیص ژن *nuc* تائید گردید.

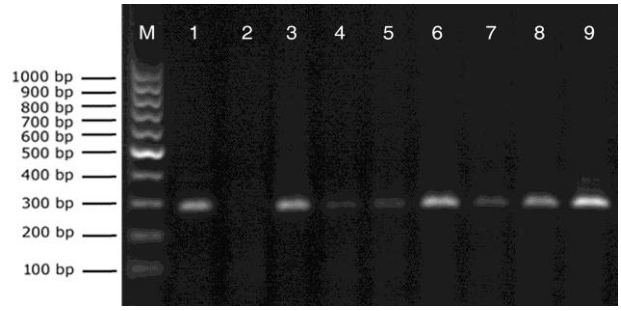
تعیین MIC و MBC نانو ذرات نقره و الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها

در این روش هر یک از نمونه‌ها پس از تهیه کشت باکتریایی در محیط کشت مولر هینتون براث در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. پس از رشد، نمونه‌ها از نظر کدورت با لوله ۰/۵ مک فارلند مقایسه شدند (تعداد باکتری $۱۰^{۹}$-$۱۰^{۸}$). سپس در میکروپلیت ۴۸ خانه‌ای، برای هر یک از چاهک‌های موجود در هر ردیف، ۸ رقت از نانو ذرات نقره (صفر، ۲۵، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) در نظر گرفته شد. به این صورت که در هر چاهک، ۹۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی اضافه شده و سپس از هر غلظت نانو ذرات نقره تهیه شده ۱۰۰ میکرولیتر، به چاهک‌ها اضافه گردید تا حجم یک میلی لیتری در کل چاهک‌ها حفظ شود (۸). جهت تعیین الگوی مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها (پنی سیلین، آمپی سیلین، آموکسی سیلین، سفازولین)، در میکروپلیت ۴۸ خانه‌ای از هر نمونه‌ی باکتریایی به مقدار ۹۰۰ میکرولیتر در چاهک‌ها ریخته شد و از هر آنتی بیوتیک طبق آنچه در قسمت روش تهیه غلظت آنتی بیوتیک‌ها آورده شد، ۱۰۰ میکرولیتر (با غلظت ۱۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر) به هر چاهک اضافه گردید. جهت تعیین MIC و MBC نانو ذرات نقره و آنتی بیوتیک‌ها بصورت توام، ۵۰ میکرولیتر از دارو و ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره به داخل هر چاهک اضافه گردید تا حجم اصلی به یک میلی لیتر برسد. میکروپلیت‌ها به انکوباتور منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس از هر چاهک به مقدار ۳۰ میکرولیتر برداشت گردیده و در محیط مولر هینتون آگار بوسیله پیپت پاستور خمیده استریل کشت تهیه شد، در مراحل بعد پلیت‌ها در گرمخانه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (۲۱). در نهایت میزان رشد باکتری در پلیت‌های کشت شده با سوسپانسیون باکتری همراه با نانو ذرات نقره و آنتی بیوتیک‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت و MIC و MBC مخلوط نانو ذرات نقره توام با آنتی بیوتیک‌های مختلف تعیین گردید.

نتایج

شناسایی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از طریق تکثیر ژن *nuc* به روش PCR

از تعداد ۳۱۱ نمونه شیر کشت شده تعداد ۷۲ جدایه مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* (کوکسی‌های گرم مثبت کاتالاز مثبت) با استفاده از کشت و آزمایشات بیوشیمیایی استاندارد مانند تخمیر مانیتول، احیائ نیترات و آزمایش کوآگولاز شناسایی و به منظور تشخیص مولکولی تحت آزمایش تکثیر ژن *nuc* اختصاصی گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* قرار گرفتند. پرایمرهای F و R مورد استفاده در این تحقیق با موفقیت قطعه‌ای با اندازه مورد انتظار ۲۷۹ جفت بازی را در تمامی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تکثیر دادند. هیچ فرآوردهٔ PCR در مورد نمونه‌های کنترل منفی که در آن از آب مقطر استریل به جای اسید نوکلئیک استفاده شده بود، بدست نیامد. از ۷۲ جدایه مشکوک ۵۸ جدایه با انجام آزمایشات بیوشیمیایی و تکثیر ژن *nuc* (شکل ۱) به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس تایید و* ۵۰ جدایه از آنها جهت انجام آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.



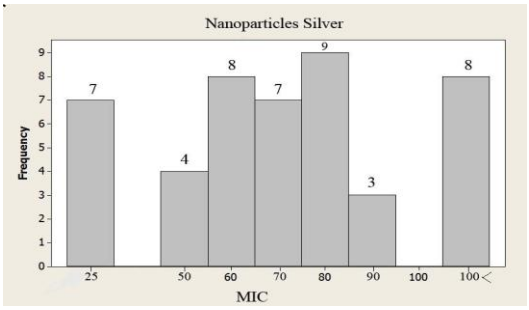
شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن *nuc*. چاهک M : مارکر DNA ladder 100 bp. چاهک ۱ : کنترل مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213). چاهک ۲ : کنترل منفی (واکنش بدون DNA). چاهک‌های ۹-۳ : محصولات PCR با اندازه مورد انتظار ۲۷۹ جفت باز .

الگوی مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها:

در این مطالعه ۵۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد تورم پستان با غلظت ۱۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر دارو با ۴ نوع آنتی بیوتیک بتالاکتام بطور جداگانه کشت گردید، که نتایج الگوی مقاومت جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به پنی سیلین، آموکسی سیلین، آمپی سیلین و سفازولین به ترتیب ۵۰٪، ۵۶٪، ۴۶ ٪ و ۳۰٪ بوده است. تعدادی از نمونه‌ها نسبت به هر یک از آنتی بیوتیک‌ها حساس یا مقاوم بودند، که تنها نمونه‌های مقاوم در تعیین MIC و MBC توام با نانوذرات نقره مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج حاصل از MIC و MBC نانوذرات نقره:

در مطالعه حاضر ۵۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* با ۸ رقت متفاوت از نانوذرات نقره مورد بررسی قرار گرفت که ۴ جدایه در غلظت ۲۵ میکروگرم/ میلی لیتر از نانوذرات نقره رشدشان مهار شد که رقت یاد شده به عنوان MBC نانوذرات نقره به ثبت رسید. به عبارتی ۸٪ از کلیه جدایه‌ها نسبت به کمترین میزان نانوذرات نقره حساس بودند، که در تعیین MIC توام با دارو مورد بررسی قرار نگرفتند و بقیه نمونه‌ها در غلظت‌های ما بین ۵۰-۱۰۰ میکروگرم/میلی لیتر مهار گردید (نمودار ۱).



نمودار ۱- اثر نانوذرات نقره بر روی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

نتایج حاصل از اثر متقابل نانوذرات نقره و آنتی بیوتیک‌ها:

همانگونه که اشاره گردید، جدایه‌هایی که نسبت به غلظت ۲۵ میکروگرم/ میلی لیتر نانوذرات نقره حساس بودند در ادامه آزمایشات حذف شدند. نتایج بر اساس ۴۶ جدایه باقی مانده گزارش گردیده، که در سه تکرار انجام گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج حاصل از اثر نانوذرات نقره و اثر متقابل نانوذرات نقره و آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام

تیمار / نمونه مقاوم	نانوذرات نقره MIC,MBC (µg/ml)	پنی سیلین و نانوذرات نقره MIC,MBC (µg/ml)		آمپی سیلین و نانوذرات نقره MIC,MBC (µg/ml)		آموکسی سیلین و نانوذرات نقره MIC,MBC (µg/ml)		سفازولین و نانوذرات نقره MIC,MBC (µg/ml)	
۱	۷۰/۸۰	۱۰۰<	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست	۹۰/۱۰۰	آنتاگونیست		
۲	۷۰/۸۰	۱۰۰<	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست	۹۰/۱۰۰	آنتاگونیست		
۳	۱۰۰<	۹۰/۱۰۰	سینرژیست	۱۰۰<	بی اثر	۹۰/۱۰۰	سینرژیست	۲۵>	سینرژیست
۴									
۵	۱۰۰<	۹۰/۱۰۰	سینرژیست	۱۰۰<	بی اثر	۱۰۰<	بی اثر		
۶	۸۰/۹۰							۲۵>	سینرژیست
۷	۱۰۰<	۱۰۰<	بی اثر	۱۰۰<	بی اثر	۱۰۰<	بی اثر		
۸									
۹	۱۰۰<	۱۰۰<	بی اثر	۱۰۰<	بی اثر	۱۰۰<	بی اثر		
۱۰	۱۰۰<	۱۰۰<	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست		
۱۱	۱۰۰<					۲۵>	سینرژیست		
۱۲	۶۰/۷۰	۱۰۰<	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست	۲۵>	سینرژیست
۱۳	۲۵/۵۰	۹۰/۱۰۰	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست	۷۰/۸۰	آنتاگونیست		
۱۴	۸۰/۹۰	۱۰۰<	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست		
۱۵	۸۰/۹۰	۱۰۰<	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست		
۱۶	۶۰/۷۰	۱۰۰<	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست		
۱۷									
۱۸	۱۰۰<								
۱۹	۹۰/۱۰۰	۱۰۰<	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست	۹۰/۱۰۰	بی اثر		
۲۰	۵۰/۶۰	۲۵>	سینرژیست		آنتاگونیست			۵۰/۶۰	بی اثر
۲۱									
۲۲	۲۵/۵۰							۲۵>	سینرژیست
۲۳	۲۵/۵۰	۲۵>	سینرژیست					۲۵>	سینرژیست
۲۴									
۲۵									
۲۶									
۲۷	۵۰/۶۰							۲۵>	سینرژیست
۲۸	۲۵/۵۰	۱۰۰<	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست	۹۰/۱۰۰	آنتاگونیست		
۲۹	۸۰/۹۰	۱۰۰<	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست	۲۵>	سینرژیست
۳۰	۲۵/۵۰					۲۵>	سینرژیست		
۳۱	۶۰/۷۰	۲۵>	سینرژیست			۹۰/۱۰۰	آنتاگونیست		
۳۲	۱۰۰<					۲۵>	سینرژیست		
۳۳	۶۰/۷۰	۱۰۰<	آنتاگونیست	۹۰/۱۰۰	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست		
۳۴	۷۰/۸۰								
۳۵									
۳۶	۷۰/۸۰	۱۰۰<	آنتاگونیست	۹۰/۱۰۰	آنتاگونیست	۹۰/۱۰۰	آنتاگونیست		
۳۷									
۳۸	۱۰۰<	۱۰۰<	بی اثر	۱۰۰<	بی اثر	۱۰۰<	بی اثر	۲۵>	سینرژیست
۳۹	۸۰/۹۰			۲۵>	سینرژیست				
۴۰	۶۰/۷۰	۱۰۰<	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست	۱۰۰<	آنتاگونیست	۲۵>	سینرژیست
۴۱	۸۰/۹۰	۵۰/۶۰	سینرژیست	۲۵>	سینرژیست	۱۰۰<	آنتاگونیست	۲۵>	سینرژیست
۴۲									
۴۳	۷۰/۸۰			۲۵>	سینرژیست	۲۵>	سینرژیست	۲۵>	سینرژیست
۴۴									
۴۵	۷۰/۸۰					۲۵>	سینرژیست		
۴۶	۲۵/۵۰							۲۵>	سینرژیست
۴۷									
۴۸									
۴۹	۸۰/۹۰					۲۵>	سینرژیست		

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به تعداد نمونه‌های اخذ شده و موارد مثبت جداسازی شده، آلودگی گاوان منطقه به *استافیلوکوکوس اورئوس* قابل توجه می‌باشد. طبق نتایج بدست آمده از نظر حساسیت و مقاومت به آنتی بیوتیک‌های موثر بر دیواره باکتری‌ها، جدایه‌های بدست آمده از موارد ورم پستان گاو مقاومت متفاوتی نسبت به این آنتی بیوتیک‌ها داشته‌اند. سفازولین دارای بیشترین تاثیر بر روی جدایه‌ها است و درصد کمتری از جدایه‌ها به آن مقاوم بودند و در مقابل آموکسی سیلین دارای کمترین تاثیر بوده و درصد بیشتری از جدایه‌ها به آن حساس بودند. اغلب نمونه‌ها در مقابل غلظت‌های ما بین ۵۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذرات نقره مهار گردیدند. سفازولین نسبت به سایر آنتی بیوتیک‌های موثر بر دیواره باکتری‌ها، دارای بیشترین اثر سینرژیستی با نانوذرات نقره و آمپی سیلین دارای کمترین اثر سینرژیستی می‌باشد، در اغلب نمونه‌ها آمپی سیلین همراه با آنتی بیوتیک‌ها تاثیر آنتاگونیستی و یا بی‌اثر دارد. با توجه به نتایج تحقیق حاضر و نظر به اثر متفاوت سینرژیستی یک دارو با نانوذرات نقره در نمونه‌های متفاوت می توان نتیجه‌گیری نمود که احتمالا اثر سینرژیستی نانوذرات نقره علاوه بر نوع آنتی بیوتیک مورد استفاده به نوع سویه باکتریایی نیز وابسته می‌باشد. اثر توام آنتی بیوتیک‌های موثر بر دیواره با نانوذرات نقره با نتایج برخی مطالعات همخوانی و با برخی مغایرت داشت. براساس مطالعه Prashant و همکاران، سفازولین به همراه نانوذرات نقره اثر سینرژیستی در مهار باکتری‌ها داشته است، اما سفازولین با دز بالاتری نسبت به مطالعه حاضر رشد باکتری‌ها را مهار نموده است (۱۸). در تحقیق حاضر سایر بتالاکتام‌ها نسبت به سفازولین اثر سینرژیستی کمتری با نانوذرات نقره داشتند هر چند که گروه آمینو در پنی‌سیلین‌ها بایستی اثر چلاتور را داشته باشد، اما در بسیاری از جدایه‌ها این مورد اثبات نگردید که موافق با مطالعه Shahverdi و همکاران (۲۰۰۷) ولی مخالف مطالعات Fayaz (۲۰۱۰) می‌باشد (۶-۲۲). تاثیر نانوذرات نقره و داروها به باند شدن این مواد با هم و همچنین با دیواره باکتری و اتصال به دلیل شارژ مثبت یون نقره و شارژ منفی باکتری و تخریب دیواره بستگی دارد، که در میان داروهای بالا سفازولین قدرت تاثیر بیشتری نشان داد. در خصوص آنتی بیوتیک‌های موثر بر دیواره سلولی تنها سفازولین اثر سینرژیستی قابل توجهی با نانوذرات نقره نشان داد و آنتی بیوتیک‌های با مکانیسم اثر مشابه مانند پنی سیلین، آموکسی سیلین و آمپی سیلین اگرچه اثر سینرژیستی با نانوذرات نقره داشته‌اند اما میزان اثر آنها کمتر از سفازولین بوده است. در میزان تاثیر نانوذرات نقره، اندازه ذرات، دز مصرفی و مدت زمان مصرف، شکل نانوذرات، دما و pH حائز اهمیت است (۳-۵). در مطالعه Shivastava (۲۰۰۷) اثر یون نقره بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* نشان داد که یکی از دلایل اثر بهتر یون نقره بر باکتری گرم منفی را نسبت به باکتری گرم مثبت، ضخامت دیواره سلولی و وجود پپتیدوگلیکان در گرم مثبت‌ها می‌دانند (۲۳). در حالی که Jayesh (۲۰۰۸) تاثیر نانوذرات نقره و مس بر روی باکتری‌های گرم مثبت وگرم منفی تنها وجود پپتیدوگلیکان را دلیل تاثیر نمی‌دانند، نتایج مطالعه آنها MIC نانوذرات نقره بر روی برخی سوش‌های *اشریشیاکلی* را ۴۰، ۱۲۰ تا ۱۴۰ و ۱۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین نموده و روی *استافیلوکوکوس اورئوس* غلظت ۱۲۰ میکروگرم/میلی لیتر از نانوذرات نقره موثر بوده است در حالی که در *باسیلوس سوبتیلیس* با وجود داشتن پپتیدوگلیکان

ضخیم، غلظت ۴۰ میکرولیتر بر میلی لیتر نانوذرات نقره و ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذرات مس موثر بوده است (۱۰). در تحقیق Kim (۲۰۱۱) حداقل غلظت مهاری نانوذرات نقره بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش گردید که با مطالعه حاضر مطابقت می‌نماید (۱۱).

براساس نتایج مطالعه حاضر نانوذرات نقره به عنوان یک ماده ضد میکربی اثر مناسبی در افزایش اثر ضد میکروبی آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام داشته است. مطالعه اثر نانوذرات بر روی میکروارگانیسم‌ها و مطالعه سمیّت، خصوصیات و مکانیسم اثر آنها روی باکتری‌ها مورد نیاز است تا در نهایت با توجه به حفظ محیط زیست و مبارزه با میکروارگانیسم‌های مقاوم به چند دارو راهی مطمئن و بی خطر انتخاب شود.

منابع

1. Acar, J., Rostel, B. (2001). Antimicrobial resistance. *Review Science Technology* **20**: 797-810.
2. Ahamed, M., Al Salhi, M.S., Siddiqui, M. (2010). Silver nanoparticle applications and human health. *Clinical Chimical Acta* **411**: 1841-8.
3. Blanco, M., Gutierrez, M., Rodriguez, F., Roberts, M., Navas, J. (2006). Distribution of tetracycline resistance determinants in Spanish *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Antimicrobial Agent Chemotherapy* **50**: 702-8.
4. Boerlin, P., Kuhnert, P., Hussy, D., Schaellibaum, M. (2003). Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. *Journal of Clinical Microbiology* **12**: 767–71.
5. Byung, U.L., Sun, H.Y., Jae, H.J., Gwi-Nam, B. (2010). Effect of relative humidity and variation of particle number size distribution on the inactivation effectiveness of airborne silver nanoparticles against bacteria bioaerosols deposited on a filter. *Journal of Aerosol Science* **41**: 447-56.
6. Fayaz, A.M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R., Kalaichelvan, P.T., Venketesan, R. (2010). Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram negative bacteria. *Nanomedical* **6**: 103-9.
7. Fosgate, G.T., Petzer, I.M., Karzis, J. (2012). Sensitivity and specificity of a hand-held milk electrical conductivity meter compared to the California mastitis test for mastitis in dairy cattle. *Veterinary Journal*, in press.
8. Gokulakrishnan, R., Ravikumar, S., Anandha, R. (2012). *In vitro* antibacterial potential of metal oxide nanoparticles against antibiotic resistant bacterial pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* **2**: 411-3.
9. Holt, K.B., Bard, A.J. (2005). Interaction of silver (I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli* an electrochemical and scanning electrochemical microscopy studies of the antimicrobial mechanism of micro molar Ag+. *Biochemistry* **44**: 13214-23.
10. Jayesh, P., Ruparelia, A., Kumar, C., Siddhartha, P., Duttagupta, S.M. (2008). Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Apply Nanotechnology* **13**: 707-16.
11. Kim, S.H., Lee, H.S., Ryu, D.S., Choi, S.J., Lee, D.S. (2011). Antibacterial

17. Prashant, K., Liisa, P., Matthias, K., Roy, H. (2011). Mycobased biosynthesis of silver nanoparticles and studies of its synergistic antibacterial activity combined with Cefazolin antibiotic against selected organisms. *Journal of Based Apply science* **5**: 1412-27.
18. Rai, M., Yadav, A., Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of microbials. *Biotechnology Advance* **27**: 76-83.
19. Rastogi, S.H., Rutledge, V.J., Gibson, C.H., Newcombe, D.A., Branen, J.R., Branen, A.L. (2011). Ag colloids and Ag clusters over EDAPTMS-coated silica nanoparticles: synthesis, characterization, and antibacterial activity against *Escherichia coli*. *Nano medcal* **7**: 305–14.
20. Sasidharan, S., Prema, B., Yoga, L. (2011). Antimicrobial drug resistance of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *Asian Pacific Journal Tropical Biology* **1**: 130-2.
21. Shahverdi, A.R., Fakhimi, A., Shahverdi, H.R., Minaian, S. (2007). Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli. Nanomedical* **3**: 168-71.
22. Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., Dash, D. (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* **18**: 225-30.
23. Shrivastava, S., Tanmay, B.E., Roy, A., Singh, G., Rao, P.R., Dash, D. (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* **18**: 1-9.
activity of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean Journal of Microbiology and Biology* **39**: 77-85.
11. Kumar, R., Yadav, B.R., Singh, R.S. (2010). Genetic Determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitis crossbred cattle. *Current Microiology* **60**: 379-86.
12. Lee, J.H. (2003). Methicillin (Oxacillin) resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Application Environmental Journal Microbiology* **69**: 6489-94.
13. Marini, M., Niederhausern, N., Iseppi, R., Bondi, M., Sabia, C., Toselli, M. (2007). Antibacterial activity of plastics coated with silver doped organic inorganic hybrid coatings prepared by sol-gel processes. *Bio macro* **8**: 1246-54.
14. Moon, J.S., Lee A.R., Kang, H.M., Lee, E.S., Kim, M.N., Paik Y.H. (2007). Phenotypic and genetic antibiogram of Methicillin resistant *Staphylococci* isolated from bovine mastitis in Korea. *Journal of Dairy Science* **90**: 1176-85.
15. Nawrotek, P., Czernomysy, D., Borkowski, J., Fijalkowski, K., Pobucewicz, A. (2012). The effect of auto-vaccination therapy on the phenotypic variation of one clonal type of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. *Veterinary Microbiology* **155**: 434-7.
16. Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M. (2007). Does the antimicrobial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Apply Environmental Microbiology* **73**: 1712-20.

24. Yang, Y., Xudong, S., Yao-wu, Y., Chun-yu, K., Ying-jun, L., Wei, Z. (2007). Detection of *Staphylococcus aureus* in dairy products by Polymerase Chain Reaction. *Agriculture Science* **6**: 857-62.

25. Zecconi, A., Piccinini, R., Fox, L.K. (2003). Epidemiologic study of intra mammary infections with *Staphylococcus aureus* during a control program in nine commercial dairy herds. *American Veterinary medical Association* **22**: 684-88.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 8, Issue 1, 2012

The Effect of Silver Nanoparticles and Beta-Lactam Antibiotics individually and in Combination on *Staphylococcus aureus* Isolated from Cattle Mastitis

Kazemi, J.[1], Ahmadi, M.[2*], Dastmalchi Saei, H.[2], Adib Hesami, M.[3]

1- Graduated of Bacteriology MSc, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran
2- Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran
3- Postgraduate student of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran

Received Date: 2 Oct 2012 *Accepted Date: 10 Dec 2012*

Abstract

Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus strains against beta-lactam antibiotics have specified. Because of drug resistance the treatment of staphylococcal mastitis is difficult and resistance transmission to human is possible. Use of modern technology for treatment is necessary and the therapeutic properties of silver nanoparticles have already been proven. In the present study, 311 milk samples were collected from mastitis casase in cattle. California mastitis test (CMT) used for detection of mastitis cases and bacteriological cultures carried out on all milk samples in order to identify the S. aureus. In addition to accurate identification of S. aureus, nuc gene was amplified by PCR. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles and antibiotics individually and in combination were determined on 50 S. aureus as isolates. Patterns of S. aureus isolates resistance to penicillin, amoxicillin, ampicillin and cefazolin, were 50%, 56%, 46% and 30% respectively. 8% of all isolates were sensitive to low levels of silver nanoparticles. Based on this study, silver nanoparticles in combination with beta-lactam antibiotics have more effect on S. aureus isolates than any of the antibiotics or silver nanoparticles alone.

Keywords: *Antibiotic resistance, Staphylococcus aureus, Antibiotics affecting on cell wall, Mastitis, Silver nanoparticles*

**Corresponding author: Ahmadi, M.*
Address: Associate Professor of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran. Tel: 04412972649
Email:m.ahmadi@urmia.ac.ir