Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 4 (September - October)

Journal homepage: www.ijmm.ir

A study on antibacterial effect of nanosilver colloidal solution against *Escherichia coli* isolates from human and poultry in North-West of Iran

Raheleh Majdani

Department of Biology, Faculty of Science, University of Maragheh, Maragheh, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2016/04/12
Accepted: 2016/10/31
Available online: 2016/10/16

Article Subject:
Antimicrobial Substances

IJMM 2016; 10(4): 25-33

Corresponding author at:

Dr. Raheleh Majdani

Department of Biology, Faculty of Science, University of Maragheh, Maragheh, Iran

Tel: : 04137273068-111

Email:

rahelehmajdani@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Because of emerging resistant bacterial strains to antimicrobial agents, using effective alternatives such as silver nanoparticles has become unavoidable.

Materials and Methods: For the first time, 300 *E.coli* were isolated from humans, healthy poultry and poultry that their sensitivity were evaluated to the four different concentration of solution of colloidal silver nanoparticles (40, 80, 400 and 4000 ppm) with the size of 5 and 20 nm using standard disk diffusion method in the North-West of Iran. Then statistical analysis of the results was performed

Results: The largest zone of inhibition (ZOI) was related to suspected isolates of colibacillosis in most concentrations of both solution of silver nanoparticles. By comparing the results of different used concentrations in three groups, except the solution of 20 nm which was suspected to Colibacillosis and isolated from poultry, there was no significant difference between concentrations of 40 and 80 ppm. By using 5 nm colloidal solution, the statistically significant difference was observed in all concentration among the mean zone of inhibition in three isolated groups. Whereas, the significant difference was not shown in of 40 and 80 concentrations (ppm) among three groups isolates.

Conclusions: For effective use of antibacterial properties of single nanoparticles colloidal solutions, having enough knowledge about regional strains, their susceptibility and properties of the silver nanoparticles are inevitable.Application of colloidal solutions of silver nanoparticles as an effective antibacterial agents against *E. coli* isolates needs enough information about regional isolates and rate of their susceptibility and also properties of the nano-silver solutions.

KeyWords: Silver nanoparticles, Antibacterial effect, *Escherichia* ***coli***, Human, Poultry

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Majdani R. A study on antibacterial effect of nanosilver colloidal solution against *Escherichia coli* isolates from human and poultry in North-West of Iran. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (4) :25-33

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۴ – مهر و آبان ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی اثر ضدباکتریایی محلول کلوئیدی نانوذرات نقره بر جدایه های *اشریشیاکلی* انسانی و طیور در شمال‌غرب ایران

راحله مجدانی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۵/۰۱/۲۴

پذیرش:۱۳۹۵/۰۸/۱۰

انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۰۷/۲۵

موضوع:

مواد ضد میکروبی

IJMM 1395; 10(4): 25-33

نویسنده مسئول:

دکتر راحله مجدانی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

تلفن: ۰۴۱۳۷۲۷۳۰۶۸

پست الکترونیک:

rahelehmajdani@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: ظهور روزافزون سویه‌های باکتریایی مقاوم به مواد ضدمیکروبی، استفاده مناسب از مواد جایگزین از جمله نانوذرات نقره را جهت مبارزه با باکتریها اجتناب ناپذیر ساخته است.

مواد و روش کار: در این بررسی برای اولین بار حساسیت ۳۰۰ جدایه *اشریشیاکلی* انسانی، طیور سالم و طیور دارای علایم کلی باسیلوز، نسبت به چهار غلظت مختلف (۴۰۰۰، ۴۰۰، ۸۰ و ۴۰ppm) محلول‌های کلوئیدی نانوذرات نقره با دو اندازه ذرات ۵ و ۲۰ نانومتری با استفاده از روش استاندارد انتشار از دیسک در شمالغرب ایران ارزیابی گردید. سپس تجزیه و تحلیل آماری نتایج به دست آمده انجام شد.

یافته‌ها: بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد در اغلب غلظتهای هر دو محلول نانوذرات نقره مربوط به جدایه های مشکوک به کلی باسیلوز بود. در مقایسه دو به دوی نتایج حاصل از غلظتهای مورد استفاده در هر سه گروه به جز ذرات ۲۰ نانومتری در جدایه های طیور مشکوک به کلی باسیلوز، تفاوت معنی دار آماری فقط بین دو غلظت ۴۰ و ۸۰ ppm مشخص نگردید. با استفاده از محلول کلوئیدی ۵ نانومتری، در تمام غلظتها تفاوت آماری معنی داری در میانگین قطر هاله عدم رشد حاصل در سه گروه جدایه ها دیده شد در حالیکه در استفاده از محلول کلوئیدی ۲۰ نانومتری، تفاوت آماری معنی داری در غلظتهای ۴۰ و ۸۰ppm مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: جهت استفاده مؤثر از خصوصیات ضدباکتریایی محلول‌های کلوئیدی نانوذرات نقره، داشتن اطلاعات کافی در مورد جدایه های منطقه و میزان حساسیت آنها و نیز مشخصات نانوذرات نقره کاربردی اجتناب ناپذیر می‌باشد.

کلمات کلیدی: خاصیت ضد باکتریایی، نانوذرات نقره، *اشریشیاکلی*، انسان، طیور

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

بروز عفونتهای باکتریایی توسط سویه‌های بیماریزای *اشریشیاکلی* در انسان و حیوانات از نظر بهداشت جوامع انسانی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. با توجه به اینکه حیوانات، پرندگان و حشرات می‌توانند باکتریهای مختلف را به افراد انسانی که در تماس نزدیک با آنها قرار دارند، انتقال دهند، لذا امکان انتقال ژنهای مقاومت نیز از حیوانات به انسان وجود دارد (۲، ۱). گسترش روزافزون سویه‌های جدید باکتریایی با خصوصیات متفاوت در زمینه مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی نیز می‌تواند دلیلی بر وفور تبادل ژنهای مقاومت بین جدایه ها و سویه‌های مختلف باکتریایی باشد. طبق تحقیقات انجام گرفته، سویه‌های *اشریشیاکلی* حیوانی و بخصوص سویه‌های طیور به عنوان مخزنی مهم برای ایجاد عفونتهای ناشی از *اشریشیاکلی* در انسان مطرح شده‌اند (۳). احتمال آلودگی مستقیم یا غیرمستقیم انسانها با سویه‌های باکتریایی طیور و در نتیجه امکان دریافت ژنهای مقاومت توسط سویه‌های انسانی اهمیت مبارزه با سویه‌های بیماریزای *اشریشیا کلی* طیور در کنترل عفونت های انسانی را کاملاً روشن می‌سازد. از طرف دیگر به دلیل کاربرد بی رویه آنتی بیوتیکها در صنعت طیور به عنوان محرک رشد،

ظهور سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک *اشریشیاکلی* و گسترش نگرانی‌ها در مورد عدم کشف آنتی بیوتیک‌های جدید مؤثر، استفاده از روشها و مواد جایگزین مناسب جهت مبارزه با این باکتریها در مرغداریها را نیز اجتناب ناپذیر می‌سازد (۴). از دیرباز یونهای فلزی به عنوان مواد ضدعفونی کننده دارای پتانسیل بالا در تصفیه فاضلاب و عوامل بیمارستانی مطرح بوده‌اند (۵). علاوه بر این ترکیبات نقره به عنوان مواد دارای اثر ضدباکتریایی قوی، علیه باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی، بسیاری از میکروارگانیسم‌های هوازی و بی هوازی و سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک مؤثر بوده‌اند (۶). با وجود اینکه تعدادی از نانوذرات دیگر نیز مانند نانو ذرات مس، اکسید روی و اکسید تیتانیوم اثرات ضدمیکروبی خوبی را در مبارزه با میکروارگانیسم های بیماریزا از خود نشان داده‌اند (۸، ۷)، اما نانوذرات نقره علیه عوامل بیماریزا موثرتر بوده و سمیت پایین‌تری برای سلولهای انسانی از خود نشان داده‌اند که سبب تبدیل این ذرات به ترکیبات ضد میکروبی کاربردی در موارد پزشکی و بالینی شده است (۱۰، ۹). بنابراین گسترش و توسعه رهیافتهای جدید جهت استفاده هر چه بهتر از این پتانسیل بالای ضدمیکروبی نقره بخصوص در درمانهای دارویی موضعی مثلاً در سوختگیها و زخم-ها (۱۲، ۱۱) و استفاده در ضدعفونی کننده‌ها می‌تواند قدم موثری در مبارزه با عوامل بیماریزای مقاوم به آنتی بیوتیکها باشد، لذا نانوذرات نقره در سالهای اخیر به عنوان یکی از محصولات ضد میکروبی کاربردی فناوری مدرن در عرصه‌های مختلف پزشکی و صنعتی وارد شده است (۱۳).

از سوی دیگر یکی از منابع مهم تأمین پروتئین حیوانی در ایران گوشت طیور می‌باشد و ارتباط نزدیک‌تر جوامع انسانی با طیور در مقایسه با حیوانات دیگر در سطوح مختلف از مرغداریها تا مراکز فروش و منازل، امکان انتقال هرچه بیشتر ژنهای مختلف را از طیور به انسانها فراهم می‌کند، لذا در این مطالعه برای کسب اطلاعات بیشتر در مورد حساسیت جدایه های *اشریشیاکلی* بیماریزای انسان و طیور و نیز بررسی میزان حساسیت جدایه های طیور فاقد علایم بالینی که به عنوان مخزن اصلی انتقال ژنهای مقاومت از طیور به انسان مطرح می‌باشد (۳)، سه گروه از جدایه ها مورد استفاده قرار گرفتند که نتایج حاصل می‌تواند در ایجاد یک نمای کلی از تبادلات ژنتیکی بین جدایه های *اشریشیاکلی* انسان و طیور نیز مفید باشد. علاوه بر این با داشتن اطلاعاتی در این زمینه احتمال نیاز به روش متفاوتی جهت مبارزه با هر گروه از جدایه ها وجود دارد. در این تحقیق مقادیر و غلظت مناسب نانوذرات نقره برای هریک از گروهها مشخص شد که این امر می‌تواند در مقیاس وسیع، صرفه جویی قابل توجهی را در کنار توجه به روند مبارزه موثرتر با باکتری‌های بیماری‌زا با استفاده از نانوذرات نقره در مرغداریها به دنبال داشته باشد.

در مطالعه حاضر پس از جداسازی و شناسایی باکتریهای *اشریشیاکلی* از نمونه‌های عفونتهای انسانی، نمونه‌های حاصل از طیور مشکوک به کلی باسیلوز و طیور فاقد علایم بالینی، میزان حساسیت جدایه های سه گروه مذکور در برابر تأثیر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف دو محلول نانوذرات نقره کلوئیدی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جدایه های باکتریایی

در این مطالعه سه منبع مختلف برای اخذ نمونه‌های لازم جهت جداسازی باکتریهای *اشریشیاکلی* مورد استفاده قرار گرفت. گروه اول جدایه ها شامل ۱۰۰ باکتری جداشده از ۱۱۰ نمونه عفونتهای ادراری انسانی بود که از مراکز درمانی مختلف شهرستان مراغه جمع آوری گردید. گروه دوم شامل ۱۰۰ جدایه باکتریایی مربوط به طیور مشکوک به کلی باسیلوز بود که از ریه، قلب و کبد ۱۰۷ مورد از تلفات طیور مرغداریهای اطراف مراغه به دست آمد و گروه سوم شامل ۱۰۰ باکتری *اشریشیاکلی* جداشده از ۱۱۱ نمونه مدفوعی طیور فاقد علایم بالینی بود که نمونه‌های اخیر نیز از مرغداریهای اطراف مراغه به دست آمد. محدوده زمانی نمونه گیری جهت جداسازی هر سه گروه از جدایه ها تیر ماه ۹۴ تا بهمن ماه ۹۴ بود. برای جداسازی باکتریها ابتدا نمونه‌ها روی محیط مکانکی آگار (MCA) کشت داده شدند و سپس شناسایی و تأیید کلنی های باکتریایی مشکوک به *اشریشیاکلی* با استفاده از محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار (EMB agar) و تستهای بیوشیمیایی IMViC انجام گرفت (۱۴). در مرحله بعدی جدایه های *اشریشیاکلی* قبل از استفاده در آزمون سنجش حساسیت باکتریایی، در محیط لوریا برتانی آگار (LB agar) به عنوان یک محیط مغذی کشت داده شدند.

آماده سازی دیسک‌های نانوذرات نقره

دو محلول کلوئیدی نانوذرات نقره حاوی نانوذرات با اندازه‌های ۵ و ۲۰ نانومتر با نام تجاری نانوسید (NANCID L2000, purity 99%) از شرکت نانونصب پارس در ایران تهیه گردید (۱۵). سپس رقتهای ۴۰۰۰، ۴۰۰، ۸۰ و ۴۰ppm از هر یک از دو محلول آماده شد. برای آماده سازی دیسکهای کاغذی نانوذرات نقره، پس از استریل کردن دیسکهای کاغذی با قطر ۶ میلی متر، میزان ۱۰ میکرولیتر از هریک از چهار غلظت محلولهای کلوئیدی تهیه شده بطور جداگانه روی هر دیسک بارگذاری شد و دیسکها در محیط استریل در دمای اتاق خشک شدند.

آزمایش سنجش حساسیت باکتریایی جدایه ها

اثر ضدباکتریایی چهار غلظت ۴۰۰۰، ۴۰۰، ۸۰ و ۴۰ppm از نانوذرات نقره در دو اندازه ۵ و ۲۰ نانومتری با روش انتشار از دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۶). در ابتدا از هر کشت خالص جدایه های *اشریشیاکلی* چهار کلونی تک در محیط کشت TSB (Tripticase Soy Broth) کشت داده شد و میزان غلظت سوسپانسیون های باکتریایی کشت شده با لوله نیم مک فارلند تنظیم شد. سپس سطح محیط های کشت مولر-هینتون آگار با استفاده از سوابهای استریل آغشته شده با سوسپانسیون های باکتریایی کشت داده شد به طوری که تمام سطح پلیت پوشیده شد. در مرحله بعد دیسکهای کاغذی آماده شده به طریق آسپتیک، با رعایت فاصله مناسب از یکدیگر روی سطح پلیتها قرار داده شدند. سپس پلیتها به مدت ۲۴- ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند و در مرحله بعد قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در هر موردانداره گیری شد.

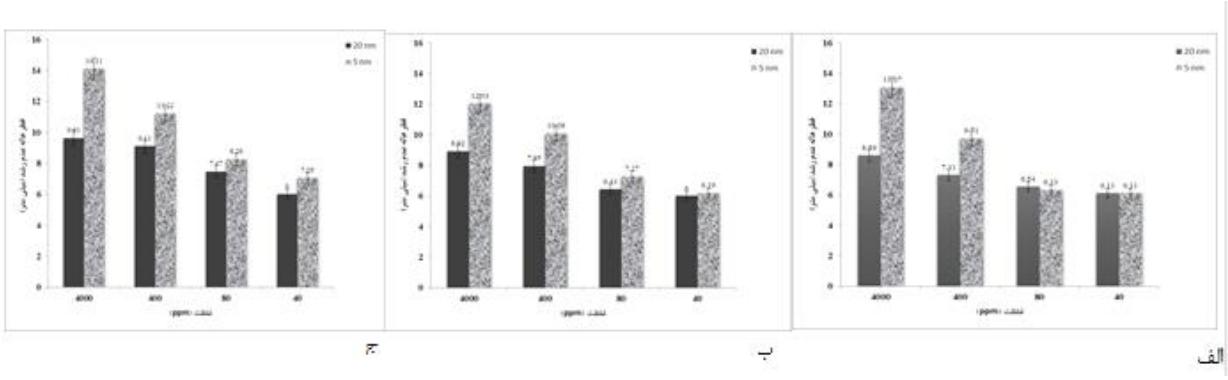
تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل در سه گروه جدایه ها بر اساس اندازه و غلظت نانوذرات با استفاده از آزمون one way ANOVA و با برنامه SPSS نسخه ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد. جهت مقایسه بین میانگین‌ها نیز از تست Tukey استفاده گردید.

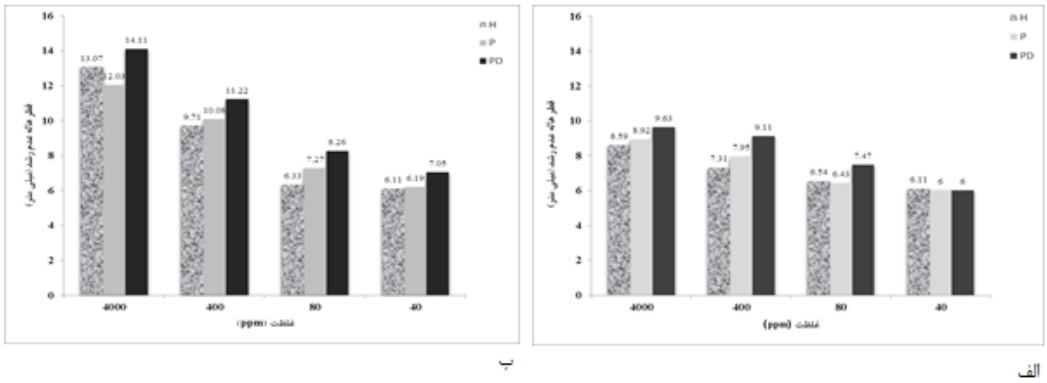
یافته‌ها

با استفاده از نانوذرات ۵ نانومتری بیشترین قطر هاله عدم رشد مشاهده شده در جدایه هایی از موارد انسانی، جدایه های طیور سالم و جدایه های طیور مشکوک به کلی باسیلوز و به ترتیب ۲۱، ۱۴ و ۲۰ میلی متر بود در حالی که با استفاده از نانوذرات ۲۰ نانومتری در هر سه گروه جدایه ها بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد ۱۱ میلی متر بود.

میانگین قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در سه گروه مختلف جدایه های *اشریشیاکلی* با استفاده از دو محلول ۵ و ۲۰ نانومتری نانونقره در غلظتهای مختلف در شکل ۱ مشخص شده است که بر اساس نمودارها، قطر هاله عدم رشد در اغلب موارد در جدایه های هر سه گروه با غلظت ۵ نانومتری بیشتر از ۲۰ نانومتری بود و فاصله بین هاله عدم رشد با استفاده از دو محلول استفاده شده در غلظتهای بالاتر این دو محلول بیشتر بود. در سه غلظت ۸۰، ۴۰۰ و ۴۰۰۰ppm با هر دو محلول ۵ و ۲۰ نانومتری فطر هاله عدم رشد در گروه جدایه های طیور دارای علایم کلی باسیلوز نسبت به دو گروه دیگر بالاتر بود، در حالیکه در غلظت ۴۰ ppm ذرات ۲۰ نانومتری هاله عدم رشد در جدایه های طیور دارای علایم کلی باسیلوز و طیور سالم، مشابه و کمتر از میانگین هاله عدم رشد جدایه های انسانی بود. در این میان در غلظت ۵ نانومتری میانگین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۴۰ ppm در جدایه های انسانی و طیور فاقد علایم بالینی تقریباً مشابه و کمتر از میانگین هاله عدم رشد جدایه های طیور دارای علایم کلی باسیلوز بود. در شکل ۲ جهت مقایسه بهتر میزان حساسیت بین سه گروه جدایه ها میانگین قطر هاله عدم رشد در جدایه های سه گروه با استفاده از محلولهای نانوذرات نقره ۲۰ نانومتری و ۵ نانومتری در غلظت‌های مختلف در دو نمودار (الف و ب) ترسیم شده است.



شکل ۱: نمودارهای میانگین هاله عدم رشد جدایه های *اشریشیاکلی* با استفاده از چهار غلظت مختلف نانوذرات نقره ۵ و ۲۰ نانومتری در موارد انسانی (الف)، طیور فاقد علایم بالینی (ب) و طیور دارای علایم کلی باسیلوز (ج)



شکل ۲: مقایسه میانگین هاله عدم رشد باکتریهای اشریشیاکلی با استفاده از نانوذرات نقره ۲۰ نانومتری (الف) و ۵ نانومتری (ب) در جدایه های انسانی (H)، جدایه های طیور فاقد علایم بالینی (P) و جدایه های طیور دارای علایم بالینی کلی باسیلوز (PD)

محاسبات آماری

جدایه های *اشریشیاکلی* عفونت‌های ادراری انسانی

الف) ذرات ۵ نانومتری: تفاوت معنی دار آماری بین میانگین قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در اثر استفاده از چهار غلظت نانوذرات ۵ نانومتری وجود داشت. در مقایسه دو به دو میانگین قطر هاله عدم رشد بین چهار غلظت مختلف، نتایج حاصل از غلظتهای ۴۰ppm و ۸۰ppm، تفاوت آماری معنی داری نشان نداد.

ب) ذرات ۲۰ نانومتری: تفاوت معنی دار آماری بین میانگین قطر هاله عدم رشد در مورد چهار غلظت استفاده شده از نانوذرات ۲۰ نانومتری مشاهده شد. در مقایسه دو به دو میانگین قطر هاله عدم رشد بین چهار غلظت مختلف، نتایج مربوط به مقایسه چهار غلظت مختلف با یکدیگر به جز غلظت ۴۰ppm و ۸۰ppm، تفاوت آماری معنی داری داشتند.

جدایه های *اشریشیاکلی* مدفوعی طیور فاقد علایم بالینی

الف) ذرات ۵ نانومتری: تفاوت معنی دار آماری بین میانگین قطر هاله عدم رشد در چهار غلظت مختلف ذرات ۵ نانومتری وجود داشت. در مقایسه دو به دو میانگین قطر هاله عدم رشد بین چهار غلظت مختلف، غلظت‌های ۴۰ppm و ۸۰ppm، تفاوت آماری معنی داری نشان نداد.

ب) ذرات ۲۰ نانومتری: تفاوت معنی دار آماری بین میانگین قطر هاله عدم رشد در چهار غلظت مختلف نانوذرات نقره ۲۰ نانومتری مشاهده شد. در مقایسه دو به دو میانگین قطر هاله عدم رشد بین چهار غلظت مختلف غلظتهای ۴۰ppm و ۸۰ppm تفاوت آماری معنی داری نشان نداد.

جدایه های *اشریشیا کلی* طیور دارای علایم بالینی کلی باسیلوز

الف) ذرات ۵ نانومتری: تفاوت معنی دار آماری بین میانگین قطر هاله عدم رشد در چهار غلظت مختلف نانوذرات ۵ نانومتری دیده شد. در مقایسه دو به دو میانگین قطر هاله عدم رشد بین چهار غلظت مختلف به جز غلظت ۴۰ppm و ۸۰ppm، تفاوت آماری معنی داری وجود داشت.

ب) ذرات ۲۰ نانومتری: تفاوت معنی دار آماری بین میانگین قطر هاله عدم رشد در چهار غلظت مختلف نانوذرات نقره ۲۰ نانومتری وجود داشت. در مقایسه دو به دو میانگین قطر هاله عدم رشد بین چهار غلظت مختلف، تفاوت آماری معنی داری بین اثر غلظت ۴۰۰ppm و ۴۰۰۰ppm، مشاهده نگردید.

مقایسه سه گروه مختلف جدایه ها

الف) نانوذرات نقره ۵ نانومتری

غلظت ۴۰۰۰ppm: در این غلظت تفاوت آماری معنی داری بین سه گروه جدایه ها وجود داشت و در مقایسه دو به دو گروههای جدایه ها، میانگین قطر هاله عدم رشد در جدایه های انسانی تفاوت معنی داری را با دو گروه جدایه دیگر نشان نداد در حالیکه قطر هاله عدم رشد در مقایسه جدایه های طیور کلی باسیلوزی و جدایه های طیور فاقد علایم بالینی تفاوت آماری معنی داری را نشان داد.

غلظت ۴۰۰ppm: در این غلظت تفاوت آماری معنی داری بین سه گروه جدایه ها وجود داشت و در مقایسه دو به دو گروههای جدایه ها، میانگین قطر هاله عدم رشد در جدایه های مربوط به طیور با علایم کلی باسیلوز تفاوت معنی داری با دو گروه جدایه دیگر نشان داد، در حالیکه جدایه های انسانی و جدایه های طیور فاقد علایم بالینی تفاوت معنی دار آماری را در این غلظت نشان ندادند.

غلظت ۸۰ppm: در این غلظت تفاوت آماری معنی داری بین سه گروه جدایه ها وجود داشت و در مقایسه دو به دو گروههای جدایه ها، از نظر میانگین قطر هاله عدم رشد، تفاوت معنی دار آماری مشخص گردید.

غلظت ۴۰ppm: در این غلظت تفاوت آماری معنی داری بین سه گروه جدایه ها وجود داشت و در مقایسه دو به دو گروههای جدایه ها، میانگین قطر هاله عدم رشد در جدایه های مربوط به طیور با علایم کلی باسیلوز تفاوت معنی داری را با دو گروه جدایه دیگر نشان داد در حالیکه نتایج جدایه های انسانی و جدایه های مربوط به طیور فاقد علایم بالینی تفاوت معنی داری را در این غلظت نشان ندادند.

ب) نانوذرات نقره ۲۰ نانومتری

غلظت ۴۰۰۰ppm: در این غلظت تفاوت آماری معنی داری بین سه گروه جدایه ها وجود داشت و در مقایسه دو به دو گروههای جدایه ها، میانگین قطر هاله عدم رشد در جدایه های مربوط به طیور با علایم کلی باسیلوز تفاوت معنی داری را با جدایه های انسانی نشان داد، در حالیکه نتایج حاصل از جدایه های مربوط به طیور فاقد علایم بالینی تفاوت معنی داری را با دو گروه دیگر در این غلظت نشان نداد.

غلظت ۴۰۰ppm: در این غلظت تفاوت آماری معنی داری بین سه گروه جدایه ها وجود داشت و در مقایسه دو به دو گروههای جدایه ها، میانگین قطر هاله عدم رشد تفاوت معنی داری را در همه موارد نشان داد.

غلظت ۸۰ppm: در این غلظت تفاوت آماری معنی داری بین سه گروه جدایه ها وجود داشت و در مقایسه دو به دو گروههای جدایه ها، میانگین قطر هاله عدم رشد در جدایه های مربوط به طیور با علایم کلی باسیلوز تفاوت معنی داری را با جدایه های دو گروه دیگر نشان داد، در حالیکه جدایه های انسانی و جدایه های مربوط به طیور فاقد علایم بالینی تفاوت معنی داری را در این غلظت نشان ندادند.

غلظت ۴۰ppm: در این غلظت تفاوت آماری معنی داری بین سه گروه جدایه ها وجود نداشت.

بحث و نتیجه گیری

کاهش اثربخشی آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونتهای باکتریایی بروز عفونتهای باکتریایی مقاوم به آنتی بیوتیک را به عنوان یکی از مشکلات جدی در پزشکی و دامپزشکی مطرح ساخته است (**۱۷**). از طرفی خصوصیات متفاوت جدایه های باکتریایی می‌تواند سبب ایجاد حساسیت های متغیر نسبت به

مواد ضد میکروبی مانند آنتی بیوتیکها یا مواد ضدباکتریایی دیگر شود. در مطالعات محدودی که روی جدایه های باکتریایی مختلف صورت گرفته نیز حساسیت متغیر جدایه های یک گونه باکتریایی نسبت به مواد ضد میکروبی تأیید شده است (۱۸). در سالهای اخیر با پیشرفت فناوریهای نوین اخیر استفاده از نانوذرات نقره به دلیل داشتن خاصیت آنتی باکتریال به منظور کنترل عفونت‌ها مورد توجه قرارگرفته است. محلول‌های کلوئیدی نانونقره حاوی یونها و ذرات باردار کوچک نقره در یک محیط مایع بوده که به صورت سوسپانسیون یکنواختی در سراسر محیط می‌شود که استفاده از این کلوئیدهای نانوذرات نقره با میزان پایین کمترین غلظت ممانعت کننده از رشد باکتریها، به عنوان مواد ضدمیکروبی قوی جهت پیشگیری و درمان عفونتهای میکروبی و آلودگیهای محیطی از ارزش بالایی برخوردار می‌باشد (۱۹). همچنین در مطالعات صورت گرفته استفاده نانوذرات نقره حتی در غلظتهای پایین همراه با مواد ضدباکتریایی دیگر نتایج خوبی به دست آمده است (۲۰). در اغلب تحقیقات انجام شده اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره علیه تعداد محدودی از سویه‌های مرجع باکتریایی مورد بررسی قرار گرفته است. علاوه بر این شواهدی مبنی بر ارزیابی حساسیت جدایه های مختلف باکتریایی مانند *اشریشیاکلی* طیور و انسان در یک منطقه جغرافیایی و در یک بازه زمانی در برابر نانوذرات نقره در ایران یافت نگردید. لذااین مطالعه اولین گزارش از میزان حساسیت جدایه های مختلف *اشریشیاکلی* طیور سالم، طیور دارای کلی باسیلوز و جدایه های انسانی نسبت به غلظتهای متفاوت دو محلول کلوئیدی نانوذرات نقره با اندازه‌های ذرات ۵ و ۲۰ نانومتری و مقایسه نتایج حاصل از جدایه های این سه گروه *اشریشیاکلی* در شمالغرب ایران می‌باشد.

نتایج نشان داد جدایه هایی از هر سه گروه نسبت به هر چهار غلظت از نانوذرات نقره حتی کمترین غلظت استفاده شده حساسیت داشتند. در زمینه غلظتهای استفاده شده، در جدایه های انسانی و طیور فاقد علایم بالینی، استفاده از غلظت ۴۰ و ۸۰ppm از هر دو محلول حاوی ذرات ۵ و ۲۰ نانومتری اثر ضدباکتریایی مشابهی نشان داد، اما باکتریهای *اشریشیاکلی* جداشده از طیور دارای علایم کلی باسیلوز حساسیت مشابهی به غلظتهای ۴۰ و ۸۰ppm نانوذرات نقره ۵ نانومتری نشان دادند، در حالیکه حساسیت جدایه های اخیر نسبت به غلظت ۴۰ و ۸۰ppm نانوذرات ۲۰ نانومتری متفاوت بود و با استفاده از نانوذرات ۲۰ نانومتری در مورد این جدایه ها، دوغلظت ۴۰۰ و ۴۰۰۰ ppm اثربخشی ضد باکتریایی مشابهی داشتند. علاوه بر این در غلظتهای بالاتر مورد استفاده تفاوت میانگین قطر هاله عدم رشد حاصل از دو محلول کلوئیدی ۵ و ۲۰ نانومتری بیشتر مشهود بود که موارد فوق اهمیت استفاده از غلظتها و اندازه ذرات مناسب از نانوذرات نقره را در صورت کاربرد این ماده جهت استفاده ضدمیکروبی می‌رساند.

در مقایسه میزان حساسیت سه گروه جدایه ها، در غلظت ۸۰ppm محلول ۵ نانومتری تفاوت معنی دار آماری با یکدیگر داشتند، در حالیکه در استفاده از ذرات ۲۰ نانومتری، غلظت ۴۰۰ppm اثربخشی متفاوتی را بین سه گروه جدایه ها نشان داد و در غلظت ۴۰ppm در ذرات ۲۰ نانومتری جدایه های هر سه گروه حساسیت مشابهی نشان دادند. در مورد غلظتهای دیگر، در استفاده از ذرات با اندازه مختلف حساسیت متغیری در مورد جدایه های هر گروه دیده شد که در مورد هر گروه باید براساس میزان اثربخشی نانوذرات نقره علیه جدایه های آن گروه باید عمل شود.

بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق به طور کلی حساسیت جدایه های طیور فاقد علایم بالینی و جدایه های انسانی نسبت به جدایه های طیور دارای کلی باسیلوز در برابر اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره کمتر بود که این امر می‌تواند حاکی از تبادلات ژنتیکی بیشتر بین جدایه های انسانی و طیور فاقد علایم بالینی بوده و به عنوان یک عامل تهدید کننده سلامت انسانی از طریق تبادل ژن‌های مقاومت بین جدایه های انسانی و طیو فاقد علایم بالینی مطرح باشد.

نتایج بررسی‌های قبلی حاکی از ارتباط مستقیم اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره با غلظت‌های مورداستفاده از آن و ارتباط معکوس با اندازه نانوذرات بود (۱۸). این در حالی است که یافته‌های مطالعه حاضر در مورد جدایه های انسانی در غلظت ۴۰ppm اثربخشی مشابهی را در استفاده از نانوذرات ۵ و ۲۰ نانومتری نشان داد. علاوه بر این در مورد جدایه های انسانی و جدایه های طیور سالم، نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در دو غلظت ۴۰ و ۸۰ppm در استفاده از ذرات ۵ نانومتری تفاوت آماری معنی داری نداشت که با نتایج مطالعات قبلی مطابقت نداشت (۲۱).

در تحقیق Bao و همکاران اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره بر روی *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش انتشار از دیسک مشهود بود که با استفاده از نانوذرات ۱۰ نانومتری اثر ضدباکتریایی مشابهی با نتایج ما نشان داده است (**۲۲**). Naghshو همکاران میزان نانوذرات نقره مؤثر بر *اشریشیاکلی* را با روش تعیین کمترین غلظت ممانعت کننده ۴۰۰ppm گزارش نمودند (**۲۳**). یافته اخیر با نتایج ما همخوانی نداشت که البته ممکن است این اختلاف نتیجه تا حدی مربوط به تفاوت روش سنجش حساسیت باکتریایی باشد. همچنین در یک بررسی کمترین غلظت ممانعت کننده از رشد نانوذرات نقره تهیه شده در گیاهان را علیه چند جدایه مقاوم به آنتی بیوتیک *اشریشیاکلی* نانوذرات نقره ۲۰۰ppm اعلام نموده‌اند که با نتایج این مطالعه در مورد برخی از جدایه ها مطابقت دارد (**۱۸**). در تحقیقی دیگر کمترین غلظت ممانعت کننده از رشد نانوذرات نقره علیه سویه مرجع *اشریشیاکلی* ۵۰ppm گزارش شده است که با نتایج مطالعه حاضر در مورد جدایه های *اشریشیاکلی* همخوانی دارد (**۲۴**). در بررسی دیگری قطر ناحیه هاله عدم رشد ایجاد شده در اثر نانوذرات نقره علیه *اشریشیاکلی* ۱۸-۱۴ میلی متر گزارش شد که حساسیت باکتریایی مشابهی را با این مطالعه نشان داد (**۲۵**).

در این مطالعه با یک روش نیمه کمی، ارزیابی کلی و اولیه از حساسیت سه گروه جدایه های *اشریشیاکلی* به نانوذرات نقره کلوئیدی به عمل آمد که نتایج آن می‌تواند به عنوان گام اولیه و با ارزش در زمینه استفاده از مقدار مؤثر نانوذرات نقره کلوئیدی بر حسب جدایه های موجود در هر منطقه و در بازه زمانی مشخص محسوب گردد چون خصوصیات جدایه ها ممکن است برحسب زمان، مکان و منبع آنها متغیر باشد. علاوه بر این به دلیل سادگی انجام روش انتشار از دیسک برای سنجش حساسیت باکتریایی، ارزیابی آن در هر منطقه و زمانی به راحتی امکان پذیر می‌باشد. علاوه بر این تأثیر باکتری کشی قوی یونهای نقره بخصوص در محیطهای آبی به اثبات رسیده است (**۲۶**). از این رو فرم کلوئیدی نانوذرات نقره همچنین می‌تواند به عنوان یک ماده با استفاده آسان در ضدعفونی فاضلاب بیمارستانها و مرغداریها مطرح بوده و استفاده از دوز مناسب آن سبب کاهش بروز سویه‌های مقاوم به نانوذرات نقره خواهد بود. اما علی رغم موارد فوق، برای کسب نتایج علمی کامل‌تر و استفاده وسیعتر از پتانسیل بالای این ماده در پیشگیری و درمان عفونتهای میکروبی و رفع آلودگیهای محیطی مانند ضدعفونی فاضلاب، انجام آزمایشات کمی و دقیق‌تر مانند تعیین MIC و MBC برای محاسبه دوز مورد نیاز و نیز بررسی حساسیت جدایه های نواحی دیگر جهان و ایران در محدوده‌های زمانی متفاوت نسبت به نانوذرات کلوئیدی ضروری می‌باشد.

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق می‌توان گفت جدایه های سه گروه مختلف *اشریشیاکلی* جدا شده از منابع انسانی و طیور شهرستان مراغه، حساسیت متغیری در برابر نانوذرات نقره ۵ و ۲۰ نانومتری در غلظتهای ۴۰۰۰، ۴۰۰، ۸۰ و ۴۰ppm نشان دادند که در این میان کمتر بودن حساسیت جدایه های انسانی و طیور فاقد علایم بالینی نسبت به طیور دارای کلی باسیلوز می‌تواند به عنوان یک موضوع مهم در سلامت عمومی جوامع انسانی مورد توجه و بررسی بیشتر قرار گیرد. در نتیجه جهت ارائه تدابیر کنترلی مؤثر در زمینه استفاده از خصوصیات ضدباکتریایی محلول‌های کلوئیدی نانوذرات نفره، داشتن اطلاعات کافی در مورد جدایه های منطقه و میزان حساسیت آنها و نیز مشخصات نانوذرات نقره کاربردی اجتناب ناپذیر می‌باشد.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش در آزمایشگاه میکروب شناسی گروه زیست شناسی دانشگاه مراغه انجام شده است و بدین وسیله از کمکهای مسئولین آزمایشگاه قدردانی می‌شود.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7(5):e35671.
2. WHO. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Commitee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. 2010.

3. Sinha PK, Pandey K, Bhattacharya SK. Diagnosis & management of leishmania/HIV co-infection. Indian J Med Res. 2005;121(4):407-14.

4. Khademvatan S, Gharavi MJ, Rahim F, Saki J. Miltefosine-induced apoptotic cell death on Leishmania major and L. tropica strains. Korean J Parasitol. 2011;49(1):17-23.

5. Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. Indian J Med Res. 2006;123(3):399-410.

6. Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. Curr Pharm Des. 2002;8(4):319-42.

7. Mishra BB, Kale RR, Singh RK, Tiwari VK. Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. Fitoterapia. 2009;80(2):81-90.

8. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev. 2006;19(1):111-26.

9. Foroutan-Rad M, Hazrati Tappeh K, Khademvatan S. Antileishmanial and Immunomodulatory Activity of Allium sativum (Garlic): A Review. J Evid Based Complementary Altern Med. 2015: 1-15. doi: 10.1177/2156587215623126.

10. Rocha LG, Almeida JR, Macedo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. Phytomedicine. 2005;12(6-7):514-35.

11. Kolodziej H, Kiderlen AF. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on Leishmania parasitised RAW 264.7 cells. Phytochemistry. 2005;66(17):2056-71.

12. Saki J, Khademvatan S, Pazyar N, Eskandari A, Tamoradi A, Nazari P. In vitro activity of Cordia myxa Mucilage extract against Leishmania major and L. infantum promastigotes. Jundishapur J Microbiol. 2015;8(3):e19640.

13. Feily A, Saki J, Maraghi S, Moosavi Z, Khademvatan S, Siahpoosh A. In vitro activity of green tea extract against Leishmania major promastigotes. Int J Clin Pharmacol Ther. 2012;50(3):233-6.

14. Abalaka M, Mann A, Adeyemo S. Studies on in-vitro antioxidant and free radical scavenging potential and phytochemical screening of leaves of Ziziphus mauritiana L. and Ziziphus spinachristi L. compared with Ascorbic acid. J Med Genet Genomics. 2011;3(2):28-34.

15. El-Kamali HH, Mahjoub SA-T. Antibacterial activity of Francoeuria crispa, Pulicaria undulata, Ziziphus spina-christi and Cucurbita pepo against seven standard pathogenic bacteria. Ethnobot Leaflets. 2009;2009(6):6.

16. Adzu B, Haruna AK. Studies on the use of Zizyphus spina-christi against pain in rats and mice. Afr J Biotechnol. 2007;6(11).

17. Adamu HM, Abayeh O, Ibok N, Kafu SE. Antifungal activity of extracts of some Cassia, Detarium and Ziziphus species against dermatophytes. Nat Prod Radiance. 2006;5(5):357-60.

18. Abdel-Wahhab MA, Omara EA, Abdel-Galil MM, Hassan NS, Nada SA, Saeed A, et al. Zizyphus spina-christi extract protects against aflatoxin B1-initiated hepatic carcinogenicity. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2007;4(3):248-56.

19. Khademvatan S, Saki J, Gharavi MJ, Rahim F. Allium sativum extract induces apoptosis in Leishmania major (MRHO/IR/75/ER) promastigotes. J Med Plant Res. 2011;5(16):3725-32.

20. Khademvatan S, Adibpour N, Eskandari A, Rezaee S, Hashemitabar M, Rahim F. In silico and in vitro comparative activity of novel experimental derivatives against Leishmania major and Leishmania infantum promastigotes. Exp Parasitol. 2013;135(2):208-16.

21. Yousefi E, Eskandari A, Gharavi MJ, Khademvatan S. In vitro activity and cytotoxicity of Crocus sativus extract against leihmania major (MRHO/IR/75/ER). Infect Disord Drug Targets. 2014;14(1):56-60.

22. Allahdin S, Khademvatan S, Hashemitabar M, Eskandari A. In vitro activity of Camellia sinensis extracts against L. major and L. infantum promastigotes using the Colorometric MTT Assay. Urmia Med J. 2014;25(10):893-900.