مقاله تحقیقی

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۳، دوره ۶۹، شماره ۴، ۳۳۳-۳۲۵

Original Article

Journal of Veterinary Research. 69,4:325-333, 2014

تأثیر ضد میکروبی نانو ذرات نقره در شرایط in vivo و in vitro علیه استافیلوکوکوس اورئوس مولد بیماری ورم پستان تحت بالینی

محسن رشیدی[۱] سعید جبیبان دهکردی[۲] آیدا کراچی[۳] الهام شکیبا[۴] فاطمه حسین پور[۲] ستار استادهادی[۵*]

۱) گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران - ایران

۲) گروه فارماکولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد - ایران

۳) گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران

۴) گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران - ایران

۵) گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران - ایران

(دریافت مقاله: ۱۶ شهریور ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۷ آبان ماه ۱۳۹۳)

چکیده

زمینه مطالعه: ورم پستان به عنوان یکی از پرهزینه ترین بیماریهای موجود در گاوهای شیری می باشد و موجب کاهش چشمگیری در میزان تولید شیر می گردد. این بیماری، یکی از دلایل اصلی استفاده از آنتی بیوتیک در گاوهای شیری است. به نظر می رسد که استافیلوکوکوس اورئوس پاتوژن اصلی مربوط به شیوع ورم پستان در گله های گاو شیری باشد. **هدف:** هدف از این مطالعه بررسی و تعیین فعالیت ضدباکتریایی نانوسیلور علیه استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از ورم پستان های تحت بالینی در گاو است. **روش کار:** MIC با روش رقیق کردن در مایع (براث میکرودایلوشن) و MBC با کشت دادن متوالی باکتری روی مولر هینتون آگار، در غلظتی که هیچ رشد مشخصی ایجاد نشود، تعیین گردیدند. برای مطالعات in vivo، به موش های آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از ورم پستان های تحت بالینی، به مدت ۵ روز نانوسیلور با دوز ۲۵μg/mL تزریق شد. **نتایج:** نتایج نشان داده است، که MIC و MBC نانوسیلور علیه استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از ورم پستان های تحت بالینی در گاو، ۵μg/mL می باشد. به علاوه زمان فعالیت ضد میکروبی نانوسیلور علیه استافیلوکوکوس اورئوس، ۷ دقیقه بعد از افزودن نانوذرات نقره است. مطالعات in vivo بررسی اخیر، نشان داده است که تزریق ۲۵μg/mL نانوسیلور به مدت ۵ روز، به طور کامل موش های آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از ورم پستان های تحت بالینی را درمان کرد. **نتیجه گیری نهایی:** این نتایج in vitro و in vivo به وضوح نشان می دهد که نانوسیلور فعالیت ضد باکتریایی خوبی علیه استافیلوکوکوس اورئوس دارد.

واژه های کلیدی: ورم پستان، گاو شیری، موش، نانوسیلور، استافیلوکوکوس اورئوس

مقدمه

ورم پستان پرهزینه ترین بیماری در صنعت پرورش گاو شیری در تمام دنیا می باشد. به طوری که تنها در آمریکا ضرر و زیان ناشی از آن سالانه در حدود دو میلیارد دلار تخمین زده می شود. این ضرر و زیان بدلیل کاهش کیفیت شیر، برگشت دادن شیر بدلیل آلودگی توسط کارخانه های مرتبط با صنایع لبنی، کم شدن تولید شیر و خشک شدن زود هنگام کارتیه آلوده، هزینه دارو و درمان و دستمزد کارگران می باشد (۱۳،۱۵). علاوه بر این ورم پستان عامل بیشترین مصرف مواد ضد میکروبی در صنعت پرورش گاو شیری می باشد (۱۱). استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهمترین باکتری های عامل عفونت در انسان، دام و طیور می باشد. این باکتری معمولترین عامل عفونت های پوست، زخم و عفونت های خونی در بیماران بستری در بیمارستان است. در هر سال، حدود ۴۰۰۰۰۰ بیمار بستری در بیمارستان های آمریکا، آلوده به سوش های این باکتری می شوند و حدود یک چهارم آنها در اثر این عفونت جان خود را از دست می دهند (۱۹). در دامپزشکی نیز این باکتری یکی از مهمترین عوامل ورم پستان عفونی می باشد (۳). تعداد زیادی از سوش های استافیلوکوکوس اورئوس، به نام (MRSA) Multiple Resistant Staph Aureus تقریباً مقاوم به همه آنتی بیوتیک های در دسترس هستند و در بیشتر موارد تنها آنتی بیوتیک باقیمانده مؤثر بر علیه این باکتری، ونکومایسین است (۵) که جدیداً مقاومت با آن نیز در بعضی سوش های این باکتری گزارش شده است (۱۴،۲۸). بنابراین تلاش برای یافتن مواد ضد میکروبی مؤثر علیه این نوع باکتری با کمترین احتمال ایجاد مقاومت از اهمیت بالایی برخوردار می باشد. یکی از موادی که جدیداً استفاده از آن به عنوان یک ماده ضد میکروبی مجدداً آغاز شده است، نقره می باشد که یک ماده غیر سمی بوده و طیف اثر ضد میکروبی بالایی هم دارا می باشد (۱۲). تاریخچه استفاده از نقره برای درمان بیماریها در پزشکی مدرن به یکصد سال گذشته باز می گردد که از محلول نیترات نقره دو درصد در اوایل قرن بیستم استفاده می شده است. از آن زمان خصوصیات ضد باکتریایی این ماده به خوبی شناخته شده بوده است (۱۷). شناسایی و تشخیص هر چه بیشتر عوارض جانبی آنتی بیوتیک های عرضه شده به بازار و ایجاد سویه های مقاوم به این داروها و نیز پیشرفت در صنعت الکترونیک و ساخت محلول های کلوییدی نقره که حاوی ذرات نقره در ابعاد نانومتر هستند، علاقه به استفاده از نانو نقره را افزایش داده است (۱۰). ذرات نقره موجود در محلول های کلوییدی نقره اندازه ای برابر

*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۴۰۵۳۲۱۵-۰۲۱، نمابر: ۶۶۴۰۲۵۶۹-۰۲۱ Email: Ostadhadi@razi.tums.ac.ir

۱-۱۰nm دارند که این برابر ۱/۱۰۰-۱/۱۰۰۰ یک باکتری است. این اندازه کوچک باعث نفوذ این ذرات به داخل باکتری شده و سریعاً با متوقف نمودن مسیر تنفس سلول باعث مرگ باکتری می‌شوند. با توجه به خصوصیات گسترده ضد میکروبی نانوذرات نقره با وجود سمیت‌های گزارش شده در مورد این ترکیب نیاز به مطالعات بیشتر برای بررسی کارایی و سمیت آن لازم است (۲۰). هدف از تحقیق حاضر، تعیین Minimum Inhibition Concentration (MIC) و Minimum Bactericidal Concentration (MBC) محلول کلوییدی نقره و تعیین میزان تأثیر آن بر روی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ورم پستان تحت بالینی گاو و همینطور اثر این ترکیب بر موش‌های آلوده شده به این عفونت است، تا با توجه به نتایج به‌دست آمده، بتوان قضاوت صحیحی در مورد کارآیی آن و توصیه جهت مطالعه بیشتر در مورد خصوصیت آنتی باکتریال این نمود.

مواد و روش کار

جداسازی باکتری‌ها: در این تحقیق از حدود ۵۰۰ رأس گاو از ۵ گاوداری صنعتی در شهرکرد، نمونه شیر تهیه شد. این گاوها تحت شرایط متعارف و محصور گاوداری به روش صنعتی نگهداری می‌شدند. بر اساس نتایج CMT (California mastitis test)، ۵۰ رأس گاو مبتلا به ورم پستان تحت بالینی تشخیص داده شد. سپس از نمونه شیر این گاوها بر روی محیط بلاد آگار، کشت داده شد و کلونی‌های مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس را که دارای ویژگی‌های خاص خود یعنی کلونی‌های سفید، مات و همولیز مثبت بودند را برداشته و آزمون کوآگولاز با استفاده از پلاسمای خرگوش، کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم بر روی آنها انجام شد، به طوری که آزمون کوآگولاز و کاتالاز مثبت بوده و در رنگ‌آمیزی نیز کوکسی‌های خوشه‌ای گرم مثبت مشاهده شد(۲۶). سپس این باکتری در محیط (TSB) Trypticase soy broth که از محیط‌های کشت مایع مناسب جهت رشد استافیلوکوکوس است، تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای $37^{o}C$ انکوباسیون شده و رشد باکتری بر حسب ایجاد کدورت در محیط تأیید شد. سپس جهت شمارش از سوش‌های تلقیح شده به محیط TSB، رقیق سازی متوالی انجام و از غلظت‌های 10^{-5}، 10^{-6} و 10^{-7}، به مقدار ۰/۱cc روی محیط بلاد آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای $37^{o}C$ انکوباسیون شدند، سپس کلونی‌های رشد کرده روی این محیط شمارش شده و بر حسب غلظت و تعداد کلونی، تعداد باکتری در هر میلی لیتر از محیط TSB به دست آمد که این تعداد 3×10^{8} باکتری بود.

تعیین MIC و MBC: با استفاده از روش رقیق سازی متوالی، اقدام به تعیین مقادیر MIC و MBC داروهای مورد استفاده در این تحقیق یعنی پنی‌سیلین جی و نانوسیلور علیه استافیلوکوکوس اورئوس شد. به این صورت که ابتدا غلظت‌های ۰/۰۱۹۵ µg/mL تا ۱۶۰ µg/mL از داروی پنی‌سیلین جی و نانوسیلور (Plasma Chem GmbH, Germany) (Cat. No: PL-Ag-S10-10mg)(۱۰nm) با حجم ۰/۵mL تهیه شد. سپس از محیط کشت ۲۴ ساعته استافیلوکوکوس اورئوس به هر کدام از لوله‌های آزمایش ۰/۵cc، (با غلظت ۰/۱ نیم مکفارلند معادل $1/5\times10^{7}$) اضافه شد. در این مرحله لوله‌های آزمایش به انکوباتور $37^{o}C$ منتقل شدند. بعد از ۲۴ ساعت از انکوباسیون نمونه‌ها جهت تعیین MIC (50) MIC (2) و MIC 90 (8) ارزیابی شدند. جهت تعیین MBC نیز به این صورت عمل شد که از لوله‌های آزمایش ردیف در نظر گرفته شده به‌عنوان MIC و دو ردیف قبل از آن که حاوی غلظت بیشتری از پنی‌سیلین جی و نانوسیلور بودند روی محیط بلاد آگار کشت داده شد و MBC تعیین شد.

تعیین زمان تأثیر داروهای مورد آزمایش بر استافیلوکوکوس اورئوس: در مرحله بعد جهت تعیین زمان تأثیر این داروها بر استافیلوکوکوس اورئوس آزمایش زیر انجام شد. در یک لوله آزمایش حاوی محیط tryptic soy broth (TSB, Merck, Darmstadt, Germany) و پنی‌سیلین جی با غلظت MBC به‌دست آمده و در لوله آزمایش دیگر حاوی محیط TSB و نانوسیلور با غلظت MBC به‌دست آمده باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با غلظت 3×10^{8}/mL به میزان ۰/۱cc کشت داده شد. در دقایق ۰، ۱، ۲، ۴، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۵ و ساعت‌های ۱، ۲، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ پس از کشت با استفاده از لوپ استریل از این کشت‌ها نمونه‌هایی بر روی محیط بلاد آگار کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌های کشت داده شده مورد ارزیابی قرار گرفتند تا مشخص شود که دو داروی آزمایش شده پس از چه مدت زمانی قادر به جلوگیری از رشد باکتری بوده‌اند.

تعیین تأثیر داروهای آزمایش شده در شرایط in vivo: تحقیق حاضر طبق قوانین ویژهٔ حمایت از حیوانات در آزمایش‌های علمی انجام شد که مورد تأیید کمیتهٔ اخلاقی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد است. جهت انجام این آزمایش تعداد ۶۰ سر موش آزمایشگاهی نژاد Balb/c به وزن ۳۰g تا ۳۵ تهیه و به مدت یک هفته در محیط آزمایشگاه نگه‌داری شدند تا با شرایط محیط سازگاری یابند. بعد از ۷ روز و اطمینان از سلامتی، موش‌ها به طور تصادفی در ۶ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. یکی از این گروه‌ها تحت عنوان گروه کنترل و ۵ گروه دیگر گروه تیمار در نظر گرفته شدند. طی مدت نگه‌داری موش‌ها به صورت مجزا در قفس‌های متابولیک در محیط آزمایشگاه نگهداری شدند و میزان غذا و آب مصرفی، دمای بدن کنترل و ثبت می‌شد. کنترل روزانه دما با استفاده از دماسنج دیجیتال (Model: TM-917, LUTRON, Taiwan) از طریق رکتال با پروب مخصوص بود. بعد از وزن‌کشی به هر کدام از موش‌های گروه‌های تیمار به طور قرار دادی ۰/۲cc از محیط حاوی باکتری با همان غلظت مذکور (3×10^{8} / mL) به ازای هر ۳۰g وزن موش به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. در گروه کنترل هم به طور قرار دادی ۰/۲cc محیط TSB فاقد باکتری برای هر ۳۰g وزن موش تزریق گردید.

پس از ۱ هفته، تزریق داروهای پنی‌سیلین جی و نانوسیلور شروع شد. به این صورت که به گروه کنترل، سرم فیزیولوژی، به گروه تیمار اول، نیز

سرم فیزیولوژی، گروه تیمار دوم، پنی‌سیلین جی با دوز درمانی، گروه تیمار سوم، ۴ برابر MIC به‌دست آمده در این تحقیق از داروی نانوسیلور، گروه تیمار چهارم، ۵ برابر MIC به‌دست آمده در این تحقیق از داروی نانوسیلور و گروه پنجم تیمار هم ۶ برابر MIC به‌دست آمده در این تحقیق از داروی نانوسیلور به صورت داخل صفاقی تزریق شد و به مدت ۱ هفته این تزریق هر روز ادامه داشت. مراقبت‌ها و مشاهدات روزانه به مدت دو هفته از زمان شروع آزمایش، رأس یک ساعت مشخص (۱۱ صبح) جهت ثبت علائم کلینیکی دمای بدن میزان مصرف آب و غذا و همچنین میزان مرگ و میر موش‌ها صورت گرفت پس از طی دوره آزمایش (شرح داده شده در بالا)، موش‌ها با استفاده از روش فشار بر گردن و کشیدن دم قطع نخاعی شدند. از هر موش، مقدار ۳cc خون به طور مستقیم از قلب گرفته شد. سپس با استفاده از سواپ استریل از گلو کشت داده شد و بعد اقدام به بازکردن لاشه‌ها با رعایت شرایط آسپتیک شد. به این صورت که پس از ضدعفونی کردن ناحیه شکمی با الکل، در خط میانی شکم، برشی ایجاد کرده و پوست را کنار زده و از ارگان‌های داخلی شامل قلب، کبد و طحال، به صورت استریل، با استفاده از آنس استریل، روی محیط بلاد آگار کشت تهیه کرده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای $37^{o}C$ انکوبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر، به صورت زیر تجزیه و تحلیل آماری شدند.

نتایج به‌دست آمده از مطالعات باکتری شناسی، تعیین MIC و MBC و زمان تأثیر دارو بصورت توصیفی ارائه شدند. نتایج به‌دست آمده از مطالعات حیوانی با استفاده از نرم افزار کامپیوتری prism3 و برنامه آماری پراش یک طرفه (ANOVA) در سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. نتایج به‌دست آمده از مطالعات کشت میکروبی از ارگان‌های مختلف نیز به صورت توصیفی بیان گردید.

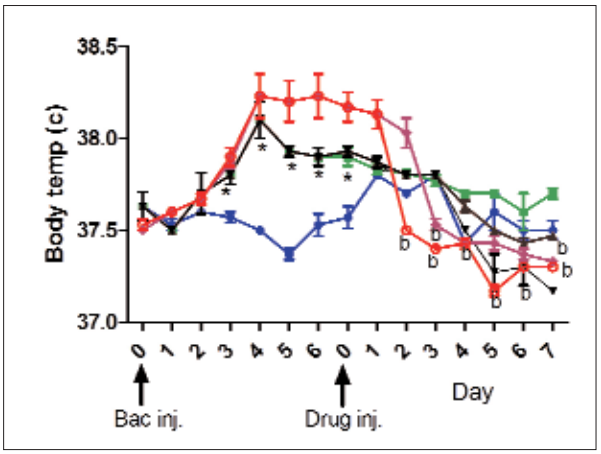
نتایج

تعیین MIC و MBC: با استفاده از روش رقیق سازی متوالی، مقادیر MIC و MBC داروهای مورد استفاده در این تحقیق یعنی پنی‌سیلین جی و نانوسیلور علیه استافیلوکوکوس اورئوس تعیین شد. همانطور که در جدول ۱ ذکر گردیده است این نتایج نشان داد که MIC برای پنی‌سیلین جی علیه استاف اورئوس در این تحقیق تقریباً ۰/۵μg/mL می‌باشد و MIC به‌دست آمده در این تحقیق برای محلول کلوئیدی نانونقره بر علیه استاف اورئوس برابر ۵μL/mL می‌باشد. نتایج جهت تعیین MBC نیز نشان داد که پنی‌سیلین جی در غلظت ۰/۵μg/mL قادر به از بین بردن باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. محلول کلوئیدی نانونقره نیز در غلظت ۵μl/ml قادر به از بین بردن این باکتری بود بنابراین MBC آن ۵μL/mL می‌باشد.

تعیین زمان تأثیر داروهای مورد آزمایش بر استافیلوکوکوس اورئوس: آزمایش انجام شده جهت تعیین زمان تأثیر این داروها بر استافیلوکوکوس اورئوس نیز نشان داد که پنی‌سیلین جی با غلظت ۰/۵μg/mL در مدت زمان کمتر از ۲ دقیقه قادر به توقف رشد استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد این نتایج نشان می‌دهد که بعد از این مدت در هیچ یک از محیط‌های بلاد آگار کشت داده شده هیچ باکتری رشد نمی‌کند. در مورد محلول کلوئیدی نانونقره با غلظت ۵μL/mL نیز تا زمان ۴ دقیقه این باکتری به فراوانی بر روی محیط کشت بلاد آگار رشد کرده ولی از این زمان به بعد توقف رشد دیده می‌شود (جدول ۱).

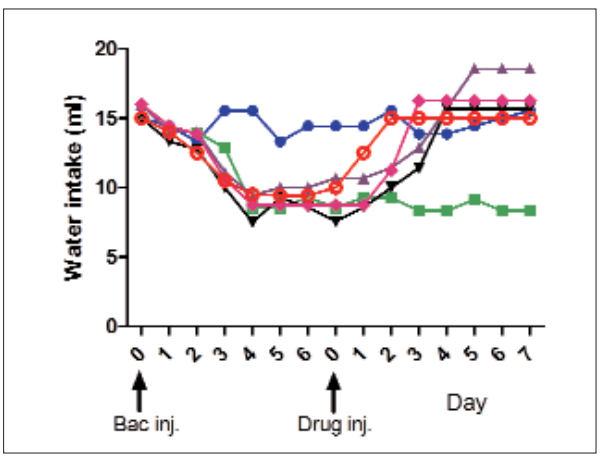
تعیین Efficacy داروهای آزمایش شده در شرایط in vivo: نمودار ۱ نشان می‌دهد که به‌دنبال تلقیح باکتری در همه گروه‌های تیمار دمای بدن افزایش یافته است در گروه تیمار یک، افزایش از یک روز بعد از تلقیح باکتری شروع شده و تا پایان آزمایش ادامه یافته است. این افزایش در روز چهار بعد از تلقیح بیشترین میزان بوده و در روزهای سوم تا هفتم پس از تلقیح باکتری نسبت به روز کنترل معنی‌دار بوده است ($p<۰/۰۵$). در گروه دوم آزمایشی نیز بدنبال تلقیح باکتری افزایش دما دیده می‌شود که در روزهای سه تا شش پس از تلقیح باکتری نسبت به کنترل معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$). در این گروه هم افزایش دما در روز چهار بیشترین میزان بوده است. پس از مصرف پنی‌سیلین دمای بدن شروع به کاهش کرده و این روند کاهشی تا انتهای آزمایش ادامه یافته است. در این گروه کاهش دمای مشاهده شده در روزهای ۶ و ۷ پس از تزریق آنتی بیوتیک نسبت به روز قبل از تزریق آنتی بیوتیک یعنی روز ۶ پس از تلقیح باکتری معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$). در گروه‌های سوم تا پنجم آزمایشی که نانونقره با دوزهای مختلف دریافت کرده بودند، وضعیت به این صورت بود که در روزهای سوم تا ششم پس از تلقیح باکتری افزایش دما نسبت به روز کنترل معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). پس از تزریق نانونقره دمای بدن شروع به کاهش کرده و این کاهش تا روز آخر آزمایش ادامه یافته است. لازم به توضیح است که کاهش دما در روزهای ۵ تا ۷ در گروه سوم، ۳ تا ۷ در گروه چهارم و ۲ تا ۷ در گروه پنجم نسبت به روز قبل از تزریق نانونقره یعنی روز شش بعد از تلقیح معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$). در گروه کنترل هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

همان‌گونه که در نمودار ۲ نشان داده شده است در مجموع میزان غذای مصرفی موش‌ها نیز به‌دنبال تلقیح باکتری کم شده است. در گروه تجربی اول این کاهش مصرف غذا از روز سوم پس از تلقیح تا روز آخر آزمایش معنی‌دار بوده است ($p<۰/۰۵$). در گروه‌های تیمار ۲، ۳، ۴ و ۵ به‌دنبال بدنبال تلقیح باکتری مصرف غذا کم شده است که این کاهش از روز سوم تا روز تزریق دارو معنی‌دار بوده است ($p<۰/۰۵$). بعد از تزریق دارو مصرف غذا افزایش یافته که این افزایش در مورد گروه تجربی پنجم از روز دوم بعد از تزریق، در مورد گروه تجربی چهارم از روز سوم بعد از تزریق دارو و در مورد گروه‌های دوم و سوم از روز چهارم بعد از تزریق دارو در مقایسه با روز قبل از تزریق دارو معنی‌دار بوده است ($p<۰/۰۵$). در مورد گروه شاهد در مورد مصرف غذا بین روزهای مختلف هیچ‌گونه تفاوتی مشاهده نمی‌شود



نمودار ۱. تغییرات دمای بدن در در اثر تلقیح داخل صفاقی ۰/۲mL از محیط حاوی ۳×۱۰^۸/mL باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ورم پستان تحت بالینی گاو به ازای هر ۳۰g وزن موش سوری. در گروه کنترل تلقیح باکتری صورت نگرفت. درگروه تیمار اول، نیز سرم فیزیولوژی، گروه تیمار دوم، پنی‌سیلین جی با دوز درمانی، گروه تیمار سوم، ۴ برابر MIC، گروه تیمار چهارم، ۵ برابر MIC و گروه پنجم تیمار هم ۶ برابر MIC به‌دست آمده در این تحقیق از داروی نانوسیلور به صورت داخل صفاقی، هر روز به مدت یک هفته تزریق شد. MIC=5 µg/mL. (*) در هر گروه اختلاف با گروه نرمال سالین +نرمال سالین معنی‌دار است (p<۰/۰۵). (**) در هر گروه اختلاف با زمان قبل از تزریق دارو معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

Norm sal+Norm sal Bac+Nor saline Bac+Pen G
Bac+4 MIC Bac+5 MIC Bac+6 MIC

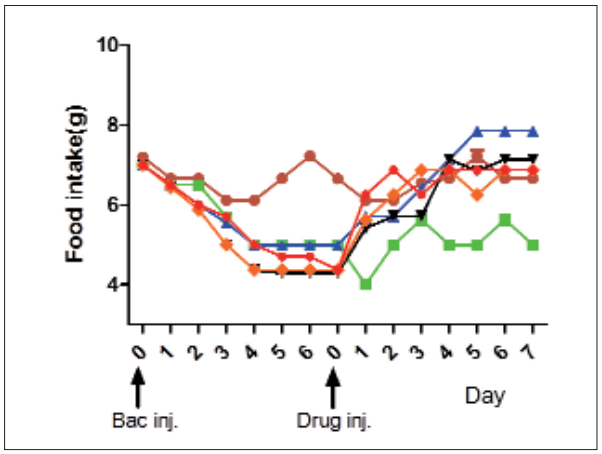


نمودار ۳. سرانه آب مصرفی در گروه‌های مختلف (mL) در اثر تلقیح داخل صفاقی ۰/۲mL از محیط حاوی ۳×۱۰^۸/mL باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ورم پستان تحت بالینی گاو به ازای هر ۳۰g وزن موش سوری. گروه‌ها مراجعه به جدول (*) در هر گروه اختلاف با گروه نرمال سالین +نرمال سالین معنی‌دار است (p<۰/۰۵). (**) در هر گروه اختلاف با زمان قبل از تزریق دارو معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

Norm sal+Norm sal Bac+Nor saline Bac+Pen G
Bac+4 MIC Bac+5 MIC Bac+6 MIC

(p>۰/۰۵).

نمودار ۳ نشان می‌دهد که در مورد میزان آب مصرفی نیز وضعیت به همین گونه است. در گروه یک تجربی مصرف آب آشامیدنی به‌دنبال تلقیح باکتری کاهش یافته است که این کاهش در مقایسه با روز کنترل از روز ۴ تا انتهای آزمایش معنی‌دار بوده است (p<۰/۰۵). در گروه‌های تجربی



نمودار ۲. سرانه غذای مصرفی در گروه‌های مختلف (g) در اثر تلقیح داخل صفاقی ۰/۲mL از محیط حاوی ۳×۱۰^۸/mL باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ورم پستان تحت بالینی گاو به ازای هر ۳۰g وزن موش سوری. در گروه کنترل تلقیح باکتری صورت نگرفت. گروه‌ها مراجعه به جدول ۲. (*) در هر گروه اختلاف با گروه نرمال سالین +نرمال سالین معنی‌دار است (p<۰/۰۵). (**) در هر گروه اختلاف با زمان قبل از تزریق دارو معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

Norm sal+Norm sal Bac+Nor saline Bac+Pen G
Bac+4 MIC Bac+5 MIC Bac+6 MIC

۲ تا ۵ نیز به‌دنبال تلقیح باکتری مصرف آب از روز سوم به طور محسوس کم شده است که این کاهش چشمگیر در گروه‌های ۴-۲ تا روز دوم بعد از تزریق دارو و برای گروه ۵ آزمایشی تا روز تزریق دارو در مقایسه با روز کنترل معنی‌دار بوده است (p<۰/۰۵). در این گروه‌ها پس از تزریق دارو مصرف آب افزایش یافته است به‌طوری‌که این افزایش در گروه پنج از روز اول بعد از تزریق دارو، در گروه‌های دو تا چهار از روز سوم پس از تزریق دارو در مقایسه با روز قبل از تزریق دارو معنی‌دار بوده است (p<۰/۰۵). مصرف آب در گروه شاهد در روزهای مختلف روندی خطی داشته و اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود (p>۰/۰۵).

تلفات ناشی از عفونت با استاف اورئوس در گروه‌های مختلف تیمار به این صورت بود که از مجموع ۵۰ سر موش که در ۵ گروه ۱۰ تایی (۵ گروه تیمار) قرار داشتند، بیشترین تعداد تلفات در روز سوم مشاهده شد در این روز ۶ سر موش تلف شد، که ۳ سر از آنها متعلق به گروه تیمار ۱ و سه سر دیگر از گروه‌های تیمار ۲ و ۳ و ۴ بوده است. در روز ۵ نیز سه سر موش متعلق به گروه‌های تجربی ۲ و ۳ و ۵ تلف شدند. دو سر موش متعلق به گروه‌های ۲ و ۵ نیز در روز هفتم پس از تلقیح یعنی در روز تزریقات و قبل از انجام عمل تزریق دارو تلف شدند. یک سر موش متعلق به گروه تجربی اول نیز در روز نهم پس از تلقیح باکتری تلف شد. پس از طی دوره آزمایش موش‌ها قطع نخاع شده، از قلب آنان خون گرفته شد، سپس از گلوی آنها روی محیط بلاد آگار کشت انجام شد. لاشه‌ها پس از ضدعفونی نمودن ناحیه شکمی با الکل باز شده و از ارگان‌های داخلی شامل قلب، کبد و طحال با آنس استریل کشت تهیه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند.

نتایج کشت از ارگان‌های مختلف: همان‌گونه که در جدول ۲، نشان داده

جدول ۱. میزان MIC و MBC و زمان شروع اثر نانو نقره و پنی سیلین جی بر روی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ورم پستان تحت بالینی در گاو.

ترکیب	دامنه رقت (µg/mL)	MIC 90 (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC50 (µg/mL)	دامنه زمان شروع اثر (دقیقه)	میانگین شروع اثر
نانوسیلور	۱۶۰- ۰/۰۱۹۵	۵	۱۰	۵	۱۰-۳	۵
پنی سیلین جی	۱۶۰- ۰/۰۱۹۵	۰/۵	۲	۰/۵	۳-۱	۲

جدول ۲. نتایج میزان تلفات و کشت از ارگان‌های مختلف از موش‌های آلوده شده به استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ورم پستان تحت بالینی گاو در گروه‌های مختلف پس از هفت روز. گروه‌ها مراجعه به قسمت ۴.۲. نتایج بر حسب درصد آلودگی موش‌ها بیان گردیده است.

	کبد٪	قلب٪	طحال٪	گلو٪	خون٪	تلفات٪
نرمال سالین+نرمال سالین	۰	۰	۰	۰	۲۰	۰
باکتری+نرمال سالین	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۰	۱۰۰	۵۰
باکتری+پنی سیلین	۱۰۰	۱۰۰	۰	۰	۱۰۰	۳۰
باکتری+۴MIC	۷۵	۷۰	۰	۰	۷۰	۲۰
باکتری+۵MIC	۴۴	۴۴	۰	۰	۵۵	۱۰
باکتری+۶MIC	۲۵	۲۵	۰	۰	۲۵	۲۰

شده است، در گروه شاهد که تنها TSB استریل دریافت کردند، در هیچ‌کدام از نمونه‌های کبد، طحال و قلب، استافیلوکوکوس اورئوس رشد نکرد. البته کشت گلوی این‌ها حاوی باکتری‌هایی بود که به استاف اورئوس شباهتی نداشتند و تنها در ۲ سر موش در کشت خون آلودگی به میزان خیلی کم مشاهده شد. در گروه تیمار ۱ که تنها استافیلوکوکوس اورئوس دریافت کردند، تمامی اندام‌ها و خون و گلو و در تمامی موش‌ها آلودگی مشاهده شد که شدت آلودگی نیز زیاد بود. در گروه تیمار ۲ که پنی سیلین جی دریافت کردند، کشت گلو مثل گروه‌های قبل، آلوده بود و در اکثر موارد، کشت قلب و کبد آلودگی شدید بود. آلودگی در کشت خون نیز در اکثر موش‌ها بالا بود. در گروه تیمار ۳ که چهار برابر MIC داروی نانوسیلور دریافت کرده بودند، همچنان گلو به شکل گروه‌های دیگر آلوده بود و در اکثر موش‌ها، آلودگی در کبد و قلب، شدید بود. در کشت خون در اکثر موش‌ها، آلودگی وجود داشت ولی شدت آلودگی نسبت به تیمار ۲ کمتر بود. در گروه تیمار ۴ که پنج برابر MIC نانوسیلور دریافت کردند، گلو به شکل گروه‌های دیگر آلوده بود، کشت قلب و کبد در نمونه‌های کمی آلوده بود. در کشت خون هم آلودگی در موش‌های کمی مشاهده شد. در گروه تیمار ۵ که شش برابر MIC نانوسیلور دریافت کردند، تنها کشت گلو آلوده بود و در ۲ سر موش هم آلودگی در قلب و ریه کم بود و تنها در ۳ سر موش کلونی‌های کمی در کشت خون مشاهده شد.

بحث

ورم پستان پرهزینه ترین بیماری در صنعت پرورش گاو شیری در تمام دنیا می‌باشد. بطوری‌که تنها در آمریکا ضرر و زیان ناشی از آن سالانه در حدود دو میلیارد دلار تخمین زده می‌شود. این ضرر و زیان بدلیل کاهش کیفیت شیر، برگشت دادن شیر بدلیل آلودگی توسط کارخانه‌های مرتبط با صنایع لبنی، کم شدن تولید شیر و خشک شدن زود هنگام کارتیه آلوده، هزینه دارو و درمان و دستمزد کارگران می‌باشد (۱۳،۱۵). علاوه بر این ورم پستان عامل بیشترین مصرف مواد ضد میکروبی در صنعت پرورش گاو شیری می‌باشد (۱۱).

استافیلوکوکوس به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل ورم پستان در سال‌های اخیر مطرح شده است. این باکتری از نمونه‌های شیر اخذ شده از گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و خصوصاً تحت بالینی در کشورهای مختلفی جدا شده است و باعث آسیب بافت و کاهش تولید شیر می‌شود (۳۰). Tenhagen و همکاران در سال ۲۰۰۶ استافیلوکوکوس اورئوس را فراوانترین باکتری جدا شده از ورم پستان در گاو در کشور آلمان گزارش کرده‌اند (۳۱).

در تحقیق حاضر هدف بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره بر استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر گاو مبتلا به ورم پستان تحت بالینی و مقایسه آن با پنی سیلین جی در شرایط in vivo و in vitro بوده است تا بدین وسیله ضمن جلوگیری از افزایش مقاومت راهی جدید جهت درمان این معضل اقتصادی پیدا شود.

همان‌گونه که قبلا ذکر شد آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام معمولاً برای درمان ورم پستان ناشی از استافیلوکوکوس استفاده می‌شوند و فعالیت ضد میکروبی خوبی نیز در مجموع دارند (۳۳). بنابراین در تحقیق حاضر MIC و MBC پنی سیلین جی به عنوان سردسته این آنتی بیوتیک‌ها به روش رقیق سازی متوالی، بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس تعیین شد که برابر ۰/۵ µg/mL بود. این مقدار در دامنه گزارش شده در تحقیقات دیگران بوده است. MIC گزارش شده برای پنی سیلین جی علیه استافیلوکوکوس اورئوس بین ۰/۲۵ µg/mL تا ۳۲µg/mL گزارش شده است (۳۲). این اختلاف در میزان MIC تفاوت و تنوع در فعالیت ضد میکروبی پنی سیلین بر علیه استافیلوکوکوس را نشان می‌دهد و همچنین از ایده انجام تست حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها قبل از اقدام به درمان حمایت می‌کند. در همین راستا Moroni و همکاران در سال ۲۰۰۴ درکشور ایتالیا اقدام به تعیین MIC50و MBC50 و نیز MIC90و MBC90 برای پنی سیلین جی در مورد ۶۴ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده ازگاوان مبتلا به ورم پستان تحت بالینی کردند. این محققین MIC50 و MBC50 را مشابه تحقیق حاضر یعنی ۰/۵ µg/mL و میزان MIC90 و MBC90 را ۲۰۰۰µg/mL گزارش کردند. دلیل فاصله زیاد بین این مقادیر این بوده است که حدود ۶۹٪ از سویه‌های استاف جدا شده به پنی سیلین مقاوم بوده‌اند (۲۱). طی مطالعه‌ای که در آرژانتین توسط Russi و همکاران در سال ۲۰۰۸، در شرایط in vitro برروی فعالیت عوامل ضد میکروبی علیه استافیلوکوکوس اورئوس عامل ورم پستان بالینی و تحت بالینی در گاو انجام شد، MIC50 و MIC90 پنی سیلین به ترتیب ۰/۵µg/mL و ۴µg/mL به‌دست آمد (۲۹). اگر چه Watts و همکاران در سال ۱۹۹۵،

تفاوتی در میزان MIC پنی سیلین بر علیه استاف در تلیسه‌ها و گاوهایی که چندین بار زایمان داشته اند گزارش نکرده‌اند، مطالعات جدید نشان می‌دهد که گونه‌های مقاوم به پنی سیلین در گاوها بسیار بیشتر از تلیسه‌ها است (۲۷). این گونه گزارش شده است که بیش از نیمی از استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از گاوهایی که چندین بار زایمان داشته اند در فنلاند به پنی سیلین جی مقاوم بوده‌اند (۲۵). ذکر این نکته ضروری است که مقاومت عامل ایجاد کننده ورم پستان به انواع آنتی بیوتیک‌ها از دو جنبه مهم است یکی آن‌که احتمال بهبودی و برگشت دام به تولید اولیه کم می‌شود، و دیگر آنکه احتمال انتقال عامل مقاومت به انسان از طریق زنجیره غذایی وجود دارد (۲۳). بنابراین تلاش برای یافتن مواد ضد میکروبی مؤثر علیه این نوع باکتری با کمترین احتمال ایجاد مقاومت همچنان ادامه دارد. یکی از موادی که جدیدا استفاده از آن به عنوان یک ماده ضد میکروبی مجدداً آغاز شده است، نقره می‌باشد. اثرات ضد میکروبی نقره از عهد باستان و یونان‌های نقره از قرن ۱۹ شناخته شد اما پس از کشف پنی سیلین در دهه ۱۹۴۰ آنتی بیوتیک‌ها به‌عنوان درمان استاندارد عفونت‌های میکروبی استفاده شدند و مصرف نقره کم شد. در طول چند دهه گذشته استفاده از نانوذرات مواد معدنی خصوصا نقره که بدلیل اندازه بسیار کوچک خود خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی منحصر به فردی از خود نشان می‌دهند، در صنایع دارو سازی افزایش یافته است (۴،۶). مکانیسم عمل نانوذرات نقره به این صورت است که در تماس با سلول باکتری جذب آن شده و با گروه تیول در آنزیم‌های تنفسی و حیاتی باکتری واکنش داده و باعث مهار و غیر فعال کردن آنها می‌شود، علاوه بر این باعث تسهیل تولید گونه‌های اکسیژن فعال و در نهایت آسیب سلول می‌شود. همچنین نانوذرات نقره تمایل زیادی برای واکنش با گروه‌های گوگرد و فسفر دارند بنابراین پروتئین‌های حاوی گوگرد در غشا سلول و ترکیبات حاوی فسفر مانند DNA محل‌های تأثیر و متصل شدن ترکیبات نانونقره می‌باشند. بنابراین با تداخل با DNA باعث افزایش دیمریزاسیون پریمیدین و جلوگیری از همانندسازی DNA می‌شود (۲۰).

تحقیق حاضر در مورد ارزیابی تأثیر نانوذرات نقره بر روی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ورم پستان می‌باشد. همان‌گونه که در قسمت نتایج نشان داده شده است در تحقیق حاضر نانوذرات نقره فعالیت ضد باکتریایی بسیار خوبی از خود نشان دادند بطوری‌که MIC و MBC آن بر علیه استاف ارئوس ۵ppm بود. این نشان می‌دهد که این مواد اثر ضد باکتریایی عالی دارند. طی مطالعه‌ای که توسط Lee و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام شد، اثر ضدباکتریایی محلول کلوییدی نانونقره علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا نومونیا نشان داد که ذرات نانوسیلور در محلول کلوییدی با غلظت ۵ ppm تأثیر ضد باکتریایی عالی علیه همه نمونه‌های حاوی استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا نومونیا داشتند و بعد از ۲۴ ساعت قادر به از بین بردن باکتری‌های ذکر شده تا ۹۹/۹۰٪ بوده است (۱۸). در مطالعه حاضر نیز محلول نانونقره توانسته است رشد استافیلوکوکوس اورئوس را مهار می‌کند و شمار کلونی‌ها نیز پس از تماس با نانونقره کاهش چشمگیر یافت. در مطالعه Cho و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز میزان MIC برای نانوذرات نقره علیه استافیلوکوکوس اورئوس ۵ppm گزارش شده است که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد (۷). MIC نانوذرات نقره علیه استاف ارئوس توسط Pal و همکاران در سال ۲۰۰۷، ۱۲/۵ µg/mL گزارش شده است که با مقدار به‌دست آمده در تحقیق حاضر مغایرت دارد یکی از دلایل آن می‌تواند این باشد که منبع تهیه نانونقره در این دو تحقیق متفاوت بوده است و نیز اندازه و شکل نانوذرات نقره در اثرات ضد باکتریایی آن بسیار مؤثر است بطوری‌که نانوذرات به شکل فنر بسیار مؤثرتر از نانوذرات به اشکال دیگر می‌باشد (۲۴). علاوه بر این گزارش شده است که نانوذرات نقره فعالیت ضد میکروبی بسیار خوبی بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، استافیلوکوکوس اپیدرمیس مقاوم به متی سیلین و استرپتوکوکوس پیوژنز دارد در حالی که فعالیت ضعیفی بر علیه سالمونلا و کلبسیلا برای آن گزارش شده است (۲۲). Alt و همکاران در سال ۲۰۰۴ اقدام به ارزیابی مقاومت و اثرات ضد باکتریایی و سمیت سلولی نمک‌های نقره و ذرات نانونقره کردند. در این تحقیق مشخص شد که ذرات نانونقره اثرات ضدباکتریایی بهتر و بیشتری نسبت به سایر آنتی بیوتیک‌ها بر روی استافیلوکوکوس اپیدرمیس، استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیس مقاوم به متی سیلین دارند. جنتامایسین فاقد اثر بر روی این اجرام بود، زیرا اجرام جداشده نسبت به این آنتی بیوتیک مقاوم بودند. این محققین گزارش کردند که ذرات نانونقره هیچ اثر سمیت سلولی نداشته، اما نمک‌های نقره اثرات سمی زیادی در سلول برجای می‌گذارند. بر اساس نتایج این تحقیق پیشنهاد شد که ذرات نانونقره فاقد اثر سمیت سلولی بوده و به شدت بر باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌های مختلف مؤثر می‌باشند (۱). Jo و همکاران در سال ۲۰۰۷ ترکیبی از نقره و اسیدهای آلی مختلف را برای جلوگیری از رشد باکتری اشریشیاکلی به کار بردند. این محققین نتیجه گرفتند که غلظت نقره موجود در ترکیب در قیاس با نوع و غلظت اسید آلی مصرف شده تأثیر بسیار بیشتری بر روی توان ضدمیکروبی این ترکیب دارد (۱۶) نتایج آزمایش تلقیح باکتری به موش در تحقیق حاضر نشان می‌دهد که بدنبال تلقیح باکتری در گروه تیماریک، دمای بدن افزایش و میزان آب و غذای مصرفی کاهش یافته است و بیشترین تلفات نیز در این گروه مشاهده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که باکتری باعث ایجاد بیماری شده است و چون این گروه هیچ‌گونه آنتی بیوتیکی دریافت نکرده‌اند، شدت بیماری و طول مدت آن در این گروه از همه بیشتر بوده است. در گروه تیمار دو تا پنج نیز بدنبال تلقیح باکتری افزایش دما و کاهش مصرف آب و غذای مصرفی مشاهده می‌شود و در این مدت نیز تلفاتی در این گروه‌ها وجود داشته است اما بدنبال مصرف پنی سیلین جی در گروه دو و نانوذرات نقره با غلظت‌های مختلف در گروه‌های سه تا پنج، دمای بدن کاهش و میزان مصرف آب و غذا نیز افزایش داشته است. همه این‌ها

نشان دهنده کارآمدی داروها می باشند. نتایج کشت میکروبی از ارگان های مختلف نیز تأیید کننده این مطلب می باشد. با مقایسه میزان آلودگی در اندام های مختلف موش هایی که تحت درمان با نانوسیلور قرار گرفته بودند، با موش هایی که تحت درمان با پنی سیلین جی قرار گرفتند، این نتیجه به دست می آید که نانوسیلور علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مؤثر و کارآمد عمل می باشد و با توجه به MIC و MBC نسبتاً پایین نانوسیلور علیه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ورم پستان های تحت بالینی در گاو، اگرچه کارایی نانوسیلور به اندازه پنی سیلین نبوده امکان استفاده از این ترکیب در عفونت ورم پستان می تواند مورد بررسی های بیشتری قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از خانم سمیرا ذوالفقاری جهت ویرایش مقاله و نکات ارزشمندشان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Alt, V., Bechert, T., Steinrücke, P., Wagener, M., Seidel, P., Dingeldein, E., Domann, E., Schnettler, R. (2004) An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. Biomaterials. 25: 4383-4391.
2. Andrews, J.M. (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicrob Chemother. 48: 5-16.
3. Bradley, A. (2002) Bovine mastitis: an evolving disease. Vet J. 164: 116-128.
4. Chaloupka, K., Malam, Y., Seifalian, A.M. (2010) Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. Trends Biotechnol. 28: 580-588.
5. Chambers, H.F. (1997) Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 10: 781-791.
6. Chen, X., Schluesener, H. (2008) Nanosilver: a nanoproduct in medical application. Toxicol Lett. 176: 1-12.
7. Cho, K.-H., Park, J.-E., Osaka, T., Park, S.-G. (2005) The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. Electrochim Acta. 51: 956-960.
8. Davison, H.C., Woolhouse, M.E., Low, J.C. (2000) What is antibiotic resistance and how can we measure it? Trends Microbiol. 8: 554-559.
9. Dowling, D., Betts, A., Pope, C., McConnell, M., Eloy, R., Arnaud, M. (2003) Anti-bacterial silver coatings exhibiting enhanced activity through the addition of platinum. Surf Coat Technol. 163: 637-640.
10. Ebbesen, M., Jensen, T.G. (2006) Nanomedicine: techniques, potentials, and ethical implications. J Biomed Biotechnol. 2006: 1-11.
11. Erskine, R., Walker, R., Bolin, C., Bartlett, P., White, D. (2002) Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. J Dairy Sci. 85: 1111-1118.
12. Feng, Q., Wu, J., Chen, G., Cui, F., Kim, T., Kim, J. (2000) A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. J Biomed Mater Res. 52: 662-668.
13. Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X., Kaltsatos, V. (2001) Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. Adv Drug Deliv Rev. 50: 245-259.
14. Hamilton-Miller, J. (2002) Vancomycin-Resistant *Staphylococus aureus*: A Real and Present Danger? Infection. 30: 118-124.
15. Hoblet, K., Schnitkey, G., Arbaugh, D., Hogan, J., Smith, K., Schoenberger, P., Todhunter, D., Hueston, W., Pritchard, D., Bowman, G. (1991) Costs associated with selected preventive practices and with episodes of clinical mastitis in nine herds with low somatic cell counts. J Am Vet Med Assoc. 199: 190.
16. Jo, S.-C., Rim, A.-R., Park, H.-J., Yuk, H.-G., Lee, S.-C. (2007) Combined treatment with silver ions and organic acid enhances growth-inhibition of *Escherichia coli* O157: H7. Food Control. 18: 1235-1240.
17. Lansdown, A. (2002) Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. J Wound Care. 11: 125-130.
18. Lee, H., Yeo, S., Jeong, S. (2003) Antibacterial effect of nanosized silver colloidal solution on textile fabrics. J Mater Sci. 38: 2199-2204.
19. Lowy, F.D. (1998) *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med. 339: 520-532.
20. Marambio-Jones, C., Hoek, E.M. (2010) A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. J Nanopart Res. 12: 1531-1551.
21. Moroni, P., Pisoni, G., Antonini, M., Ruffo, G., Carli, S., Varisco, G., Boettcher, P. (2005) Subclinical mastitis and antimicrobial susceptibility of staphy-

lococcus caprae and *Staphylococcus epidermidis* isolated from two Italian goat herds. J Dairy Sci. 88: 1694-1704.

22. Nanda, A., Saravanan, M. (2009) Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. Nanomedicine. 5: 452-456
23. Owens, W., Ray, C., Watts, J., Yancey, R. (1997) Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. J Dairy Sci. 80: 313-317.
24. Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M. (2007) Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 73: 1712-1720.
25. Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Myllys, V., Honkanen-Buzalski, T. (2004) Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. J Dairy Sci. 87: 2433-2441.
26. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., Carter, G.R. (1994) *Staphylococcus* species. In: Clinical Veterinary Microbiology (eds.). (1st ed.) Mosby, London, UK. p. 118-126.
27. Rajala-Schultz, P., Smith, K., Hogan, J., Love, B. (2004) Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. Vet Microbiol. 102: 33-42.
28. Richter, S.S., Satola, S.W., Crispell, E.K., Heilmann, K.P., Dohrn, C.L., Riahi, F., Costello, A.J., Diekema, D.J., Doern, G.V. (2011) Detection of *Staphylococcus aureus* isolates with heterogeneous intermediate-level resistance to vancomycin in the United States. J Clin Microbiol. 49: 4203-4207.
29. Russi, N.B., Bantar, C., Calvinho, L.F. (2008) Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in Argentine dairy herds. Rev Argent Microbiol. 40: 116-119.
30. Salmon, S., Watts, J., Aarestrup, F.M., Pankey, J., Yancey, J.r.R. (1998) Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. J Dairy Sci. 81: 570-578.
31. Tenhagen, B.-A., Köster, G., Wallmann, J., Heuwieser, W. (2006) Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. J Dairy Sci. 89: 2542-2551.
32. Thornsberry, C., Burton, P., Yee, Y., Watts, J., Yancey, J.r.R. (1997) The activity of a combination of penicillin and novobiocin against bovine mastitis pathogens: development of a disk diffusion test. J Dairy Sci. 80: 413-421.
33. Watts, J., Salmon, S., Yancey, J.r.R., Nickerson, S., Weaver, L., Holmberg, C., Pankey, J., Fox, L. (1995) Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers. J Dairy Sci. 78: 1637-1648.

In vivo and in vitro antibacterial effects of nanosilver against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subacute mastitis

Rashidi, M.[1], Habibian Dehkordi, S.[2], Karachi, A.[3], Shakiba, E.[4], Hosseinpour, F.[2], Ostadhadi, S.[5*]

[1]*Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran-Iran*

[2]*Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord-Iran*

[3]*Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz-Iran*

[4]*Department of Biochemistry, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran-Iran*

[5]*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran-Iran*

(Received 7 September 2014, Accepted 29 October 2014)

Abstract:

BACKGROUND: Bovine mastitis is the most costly disease in dairy cows and causes significant decrease in milk production. This disease is one of the main reasons of antibiotic therapy in dairy cows. **OBJECTIVES:** *Staphylococcus aureus* is counted as a major pathogen associated with the outbreaks of mastitis in dairy herds. Therefore, the purpose of the present study is to examine the antibacterial activity of nanosilver against *Staphylococcus aureus* isolated from subacute mastitis in cow. **METHODS:** The MIC was calculated by a broth microdilution method, and the MBC was measured by subculturing the bacteria from the wells that showed no apparent growth onto Mueller-Hinton agar. For the in vivo experiment of the current investigation we injected 25 µg/mL of nanosilver for 5 days treat mice contaminated with *Staphylococcus aureus*isolated from subacute mastitis. **RESULTS:** The results showed that the MIC and MBC of nanosilver for *Staphylococcus aureus*isolated from subacute mastitis was 5µg/mL. In addition, the results of the present study demonstrated that the time of the antimicrobial action of nanosilver against *Staphylococcus aureus* is 7 minutes after adding nanoparticles of silver. Also 5 days treatment with 25 of nanosilver treated contaminated mice with *Staphylococcus aureus* isolated from subacute mastitis. **CONCLUSIONS:** These in vitro and in vivo results clearly indicate that the nanosilver might have a good antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*.

Key words: bovine mastitis, dairy cow, mice, nanosilver, *Staphylococcus aureus*

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Changes in body temperature after intraperitoneal injection of 0.2 Ml of 3×10^8/mL medium containing *staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis per 30 g mouse. For groups see section 2.4. (*) In each groups, the differences was significant in compared with saline + saline group ($p<0.05$). θ: In each group, the difference was significant before injection ($p<0.05$).

Figure 2. Food consumption in different group (gram). after intraperitoneal injection of 0.2 ML of 3×10^8/mL medium containing *staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis per 30 g mouse. For groups see section 2.4. (*) In each groups, the differences was significant in compared with saline + saline group ($p<0.05$). θ: In each group, the difference was significant before injection ($p<0.05$).

Figure 3. Water consumption in different group (mL). after intraperitoneal injection of 0.2 ML of 3×10^8/mL medium containing *staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis per 30 g mouse .For groups see section 2.4. (*) In each groups, the differences was significant in compared with saline + saline group ($p<0.05$). θ: In each group, the difference was significant before injection ($p<0.05$).

Table 1. MIC, MBC and the onset action of silver nanoparticles and penicillin G on *Staphylococcus aureus* strains isolated from subclinical mastitis in cows.

Table 2. Mortality and the results of cultures from various tissues of mice were infected by *staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in different groups after a week. For groups see section 2.4.The results show as percentage of mice infection.

***Corresponding author's email: ostadhadi@razi.tums.ac.ir, Tel: 021-64053215, Fax: 021-66402569**