

Antibacterial effects study of nanofluid containing carbon nanotubes and evaluation of its efficacy on reducing antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*

Vahid Amiri¹, Mojgan Sheikhpour^{1, 2}, Fahimeh Shooraj¹, Masoume Parzadeh³, Morteza Masoumi¹

¹ Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

² Microbiology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

³ Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Abstract

Background: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic gram-negative bacterium that causes infections of the urinary tract, respiratory tract, skin inflammation, soft tissue infections, and a variety of systemic infections. Increased antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* has led to its introduction as one of the most important nosocomial infections. Recently, carbon nanotubes are important and effective antibacterial agents.

Materials and methods: Carbon nanotubes were prepared as carboxyl-functionalized nanofluids and then were evaluated on *Pseudomonas aeruginosa* to reduce antibiotic resistance.

Results: It was observed that multi-walled carbon nanotubes had antimicrobial effects on *Pseudomonas aeruginosa*. Bacterial resistance to the antibiotic meropenem was also significantly reduced in the presence of nanofluids containing functionalized carbon nanotubes. Thus, by co-administration of functionalized carbon nanotubes and meropenem, in the nanofluid condition, a significant reduction in growth was observed.

Conclusion: In the present study, using nanofluids containing functionalized carbon nanotubes and also increasing its stability, the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* was significantly reduced in lower dilutions than antibiotics alone. However, more specialized cellular and molecular research are needed to obtain more accurate results.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Multi-walled carbon nanotubes, Nanofluid, antibiotic resistance.

Cited as: Amiri V, Shetikhpour M, Shooraj F, Parzadeh F, Masoumi M. Antibacterial effects Study of nanofluid containing carbon nanotubes and evaluation of its efficacy on reducing antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2021; 31(3): 276-283.

Correspondence to: Mojgan Sheikhpour

Tel: +98 9122969712

E-mail: m_sheikhpour@pasteur.ac.ir

ORCID ID: 0000-0002-1927-6555

Received: 27 Dec 2020; **Accepted:** 20 Apr 2021

بررسی اثرات ضد باکتریایی نانوسیال حاوی نانولوله های کربنی و ارزیابی کارایی آن بر کاهش مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری سودوموناس آئروژینوزا

وحید امیری^۱، مژگان شیخ پور^{۱،۲}، فهیمه شوریج^۱، معصومه پرزده^۳، مرتضی معصومی^۱

^۱ بخش سل و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

^۲ مرکز تحقیقات میکروبیولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

^۳ بخش میکروبیولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا نوعی باکتری گرم منفی فرصت طلب و عامل عفونت های دستگاه ادراری، دستگاه تنفسی، التهاب پوست، عفونت های بافت نرم و انواع عفونت های سیستمیک است. افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک در سودوموناس آئروژینوزا منجر به معرفی آن به عنوان یکی از مهم ترین عفونت های بیمارستانی شده است. اخیراً نشان داده شده است که نانولوله های حاوی کربن از عوامل ضد باکتریایی مهم و کارآمد هستند.

روش بررسی: نانولوله های کربنی به صورت نانوسیال عامل دار با کربوکسیل تهیه و سپس بر روی سودوموناس آئروژینوزا به منظور کاهش مقاومت آنتی بیوتیکی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: در این مطالعه مشاهده شد که نانولوله های کربنی چند جداره اثرات ضد میکروبی بر سودوموناس آئروژینوزا دارند. همچنین مقاومت باکتری در برابر آنتی بیوتیک مروپنم در حضور نانوسیال حاوی نانولوله های کربنی عاملدار شده به طور قابل توجهی کاهش می یابد. بدین ترتیب که در حالت اثردهی نانوسیال عاملدار حاوی نانولوله های کربنی با آنتی بیوتیک مروپنم کاهش رشد به صورت قابل توجهی مشاهده شد.

نتیجه گیری: در پژوهش حاضر با استفاده از نانوسیال عاملدار حاوی نانولوله های کربنی و همچنین بالا بردن میزان پایداری آن، مقاومت آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا به شکل چشم گیری در رقت های پایین تری نسبت به آنتی بیوتیک به تنهایی کاهش یافت. با این حال، برای به دست آوردن نتایج دقیق تر، تحقیقات تخصصی سلولی و مولکولی بیشتری مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، نانولوله های کربنی چند جداره، نانوسیال، مقاومت آنتی بیوتیکی.

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) نوعی باکتری فرصت طلب و جزو یکی از مهم ترین پاتوژن های بیمارستانی محسوب می شود. این باکتری باسیل گرم منفی،

اکسیداز مثبت، متحرک و دارای یک تا سه فلاژل قطبی است (۱). از علائمی که باکتری سودوموناس آئروژینوزا ایجاد می کند، می توان به عفونت های دستگاه ادراری، دستگاه تنفسی، التهاب پوست، عفونت های بافت نرم و انواع عفونت های سیستمیک اشاره کرد (۲). مقاومت میکروبی یکی از بزرگ ترین تهدیدهای سلامت در سراسر جهان است. با وجود انواع آنتی بیوتیک ها، نشان داده شده است که سودوموناس آئروژینوزا در برابر طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها بسیار مقاوم است؛ به همین منظور مرگ و میر

آدرس نویسنده مسئول: تهران، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی، انستیتو پاستور، مژگان شیخ پور

(email: m_sheikhpour@pasteur.ac.ir)

ORCID ID: 0000-0002-1927-6555

تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۱۰/۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱/۳۱

ناشی از عفونت‌های این باکتری بسیار نگران کننده است (۳). سودوموناس آئروژینوزا باعث عفونت‌های شدید، به ویژه در موارد مراقبت‌های بهداشتی و در بیماران با نقص ایمنی می‌شود و همچنین از ظرفیت برجسته‌ای برای انتخاب و گسترش مقاومت ضد میکروبی در داخل بدن برخوردار است (۴، ۵). افزایش مقاومت به چند دارو (MDR) Multi drug resistance در سودوموناس آئروژینوزا یک مشکل بهداشت عمومی در بین بیماران بستری در بیمارستان است. با این حال، سازمان بهداشت جهانی باکتری سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به کارپانم را به عنوان یک عفونت بیمارستانی بسیار جدی معرفی کرده است (۶، ۷). مروپنم یکی از آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف از دسته بتالاکتام‌ها و گروه کارباپنم‌ها است که در حال حاضر در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری سودوموناس آئروژینوزا مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آنتی بیوتیک با نفوذ در سلول باکتریایی باعث تداخل در سنتز دیواره باکتری و سپس منجر به مرگ باکتری می‌شود (۸، ۹). مروپنم از جمله داروهای مهم از دسته کارباپنم‌ها و با طیف اثر بسیار گسترده و پایدار نسبت به بتالاکتام‌ها است که در درمان مقاومت‌های دارویی به ویژه در گرم منفی‌ها کاربرد دارند که تا حدودی از دسترس مقاومت باکتریایی در امان مانده‌اند. در سال‌های اخیر مقاومت به کارباپنم‌ها در درمان سودوموناس آئروژینوزا و خانواده انتروباکتریاسه در کشور ما به شدت در حال گسترش است و این مقاومت اکتسابی روزافزون به ویژه نسبت به مروپنم نسبت به کارباپنم‌ها مشکلات درمانی جدی را به وجود آورده است (۱۰، ۱۱). بنابر این استفاده از روش‌های جدید در جهت بهبود دارو رسانی و افزایش تاثیر داروها می‌تواند کمک قابل توجهی به غلبه بر مشکل مقاومت های دارویی نماید.

امروزه، طبق مطالعات انجام شده بر روی نانوذرات، به دلیل نسبت سطح به حجم زیاد و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی بی نظیر آنها، به خواص ضد باکتریایی آنها توجه ویژه‌ای شده است (۱۲). نانولوله‌های کربنی (CNTs) carbon nano tubes از نظر سازگاری با سیستم‌های بیولوژیکی، خواص مکانیکی، الکتریکی، حرارتی و طیف سنجی بسیار مورد توجه قرار می‌گیرند (۱۳، ۱۴). نانو لوله‌های کربنی به دو دسته نانولوله‌های تک جداره single wall carbon nanotubes (SWCNTs) و نانولوله‌های چند جداره multi walled carbon nanotubes (MWCNTs) تقسیم بندی می‌شوند که طبق مطالعات MWCNTs ها دارای خواص آنتی بیوتیکی

هستند (۱۵، ۱۶). عامل دار کردن نانولوله‌های چند جداره با عامل کربوکسیل MWCNTs-COOH در بهبود خاصیت ضد میکروبی آن موثر است و باعث افزایش خواص ضد میکروبی آن می‌شود (۱۷). در این مطالعه تلاش شد تا اثرات ضد میکروبی نانولوله‌های کربنی چند جداره به صورت نانوسیال عامل دار با کربوکسیل و همچنین تاثیر آن با داروی مروپنم به طور همزمان بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو به منظور کاهش مقاومت آنتی بیوتیکی آن مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روشها

تهیه و شناسایی سویه ها

در این تحقیق، سویه‌های استاندارد و پاتوژن باکتری سودوموناس آئروژینوزا از بخش میکروب شناسی انستیتوپاستور ایران تهیه شد. سویه‌های اخذ شده از بانک میکروبی بر روی محیط بلاد آگار و سپس بر روی محیط مک کانکی کشت داده شدند و با استفاده از روش‌های رایج آزمایشگاهی از قبیل رنگ آمیزی دیواره باکتری و تهیه لام اسمیر موفولوژی باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. سپس با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی از جمله آزمون‌های اکسیداز، کاتالاز، TSI، آزمون سیترات، تخمیر انواع قندها، اندول، حرکت در محیط SIM، VP و MR مورد شناسایی قرار گرفتند. برای تایید نهایی شناسایی باکتری‌ها تعیین توالی ژنومی صورت گرفت. برای این منظور پس از استخراج DNA و با استفاده از پرایمر 16s rRNA که توالی آن در جدول ۱ ذکر شده است، PCR، تعیین توالی و Blast جهت تایید نهایی سویه انجام شد.

جدول ۱. توالی‌های پرایمر 16s rRNA جهت تعیین توالی

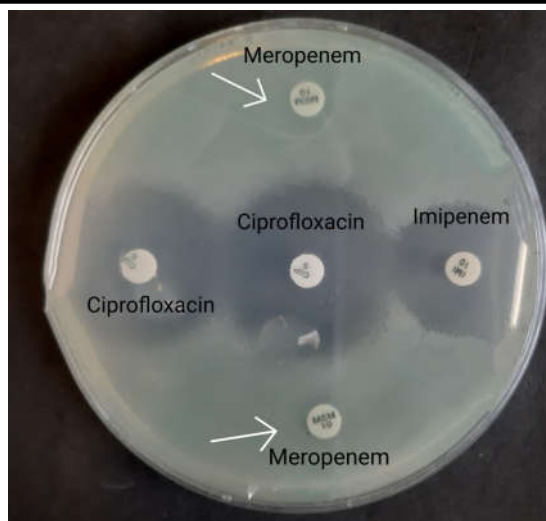
پرایمر	سایز محصول
16s rRNA Forward	163 bp
5'-TAGGTGGCAAGCGTTATC-3'	
16s rRNA Reverse	163 bp
5'-GGTGTTCCTCCATATCTC-3'	

تهیه نانوسیال حاوی نانولوله‌های کربنی چند جداره (MWCNTs)

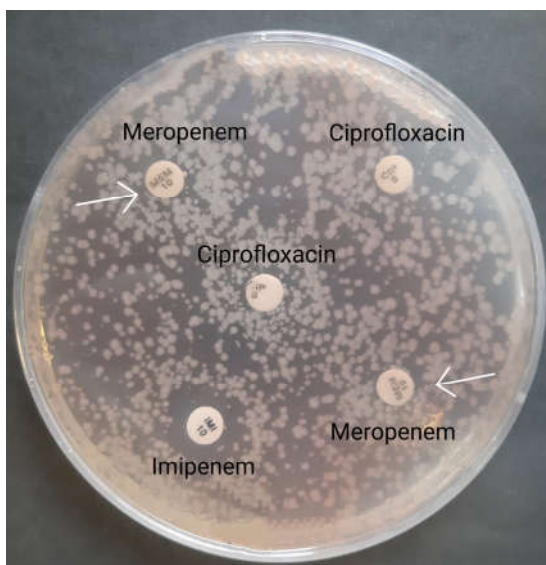
مقدار ۰/۲g از پودر CNT به همراه ۶mL اتانول ۹۶٪ همراه با ۰/۰۶g صمغ عربی به ۱۰۰mL آب دیونیزه اضافه شد، سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک با توان ۲۰۰ وات قرار گرفت (۱۸).

تست‌های میکروبی

برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سویه‌های باکتری از روش انتشار دیسک Disc diffusion در محیط مولر آگار استفاده شد؛



شکل ۱. نتایج تست آنتی بیوگرام در سویه استاندارد. دیسک آنتی بیوتیک مروپنم در سمت بالا و پایین پلیت دارای بیشترین مقاومت و دیسک های آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در وسط و سمت چپ و همچنین دیسک آنتی بیوتیک امی پنم سمت راست پلیت به ترتیب دارای کمترین مقاومت هستند.



شکل ۲. نتایج تست آنتی بیوگرام در سویه پاتوژن. دیسک آنتی بیوتیک مروپنم در سمت چپ و راست پلیت و دیسک آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در وسط پلیت دارای بیشترین مقاومت و دیسک امی پنم در بالا و پایین پلیت دارای کمترین مقاومت است.

نتایج MBC

نتایج به دست آمده از اثردهی باکتری و آنتی بیوتیک نشان داد که در سویه پاتوژن در رقت (۰/۲۵ mg/mL) ۱/۴ و کمتر عدم رشد مشاهده شد و در رقت های بالا (۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴) رشد مشاهده شد (شکل ۳). در سویه

بدین منظور دیسک های سیپروفلوکساسین (۵μL)، امپینم (۱۰ μL) و مروپنم (۱۰ μL) در محیط مولر آگار قرار داده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از ۲۴ ساعت با استفاده از خط کش قطر هاله رشد اندازه گیری و طبق جدول Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (۱۹) حساسیت آنتی بیوتیکی مورد بررسی قرار گرفت. بعد از مشخص شدن مقاومت آنتی بیوتیک مروپنم، ماده موثره آن از شرکت دارویی اکسیر (MEROPENEM 500 EXIR) تهیه و غلظتی برابر ۱ mg/mL جهت تعیین حداقل دوز مهار کنندگی (MIC) minimum inhibitory concentration تهیه شد. در مرحله بعد در یک میکروپلیت ۹۶ خانه مقدار ۱۰۰ mL سوسپانسیون میکروبی به همراه دوز های مختلف آنتی بیوتیک (۱، ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴) به صورت سریالی به تنهایی در هر کدام از چاهک ها ریخته شد. در میکروپلیت ۹۶ خانه دیگر مقدار ۱۰۰ mL سوسپانسیون میکروبی به همراه دوز های مختلف از نانوسیال حاوی نانولوله های کربنی (۰/۲۰ mg/mL تا ۰/۰۲ mg/mL) به صورت سریالی در هر چاهک ریخته شد. در مرحله بعدی آنتی بیوتیک و نانوسیال حاوی نانولوله های کربنی به صورت هم زمان طبق دوز های ذکر شده در بالا در میکروپلیت ۹۶ خانه در هر چاهک قرار گرفت. تمام میکروپلیت ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت از انکوباسیون به منظور تعیین حداقل دوز کشندگی (MBC) concentration انجام شد. در این مرحله به وسیله لوپ استریل مقداری از باکتری مربوط به هر چاهک بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده و سپس در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگه داری شدند. بعد از ۲۴ ساعت نتایج مشاهده شد.

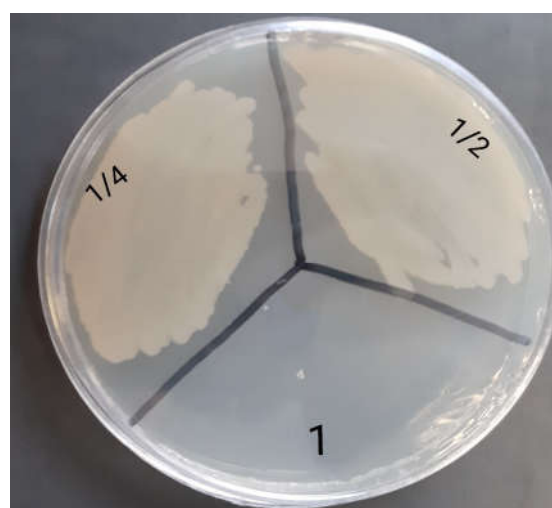
یافته ها

نتایج آنتی بیوگرام در این تحقیق طبق شکل ۱ و ۲ و جدول ۲ نشان داد که بیشترین مقاومت در سویه استاندارد مربوط به آنتی بیوتیک مروپنم (۱۰ μg) و کمترین مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین (۵ μg) است. در سویه پاتوژن طبق مشاهدات بیشترین مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک های مروپنم و سیپروفلوکساسین و کمترین مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک امی پنم (۵ μg) بود.

استاندارد در رقت (۰/۱۲ mg/mL) و کمتر عدم رشد مشاهده شد و در رقت‌های بالا طبق شکل ۴ رشد مشاهده شد.

جدول ۲. نتایج آنتی بیوگرام برای سویه های استاندارد و پاتوژن سودوموناس آئروژینوزا

آنتی بیوتیک	غلظت	سویه استاندارد	سویه پاتوژن
		قطر هاله عدم رشد	قطر هاله عدم رشد
سیپروفلوکساسین	۱۰ μg	۱۶Mm	(مقاوم)
امی پنم	۵ μg	۱۵Mm	۷Mm
مروپنم	۵ μg	(مقاوم)	(مقاوم)



شکل ۳. نتایج اثردهی آنتی بیوتیک (مروپنم) بر روی باکتری پاتوژن. در رقت های ۱/۴ و ۱/۲ و کمتر رشد مشاهده و در رقت ۱ و بیشتر عدم رشد مشاهده شد.

نتایج بدست آمده از اثردهی باکتری به همراه نانوسیال حاوی نانولوله‌های کربنی نشان داد که در سویه پاتوژن تا رقت (۰/۰۶ mg/mL) ۳۰ μL رشد کامل مشاهده شد و در رقت (۰/۰۸ mg/mL) ۴۰ μL کاهش رشد و در رقت (۰/۱ mg/mL) ۵۰ μL به عدم رشد مشاهده گردید (شکل ۵)، همچنین در سویه استاندارد عدم رشد در رقت (۰/۰۸ mg/mL) ۴۰ μL طبق شکل ۶ مشاهده شد.

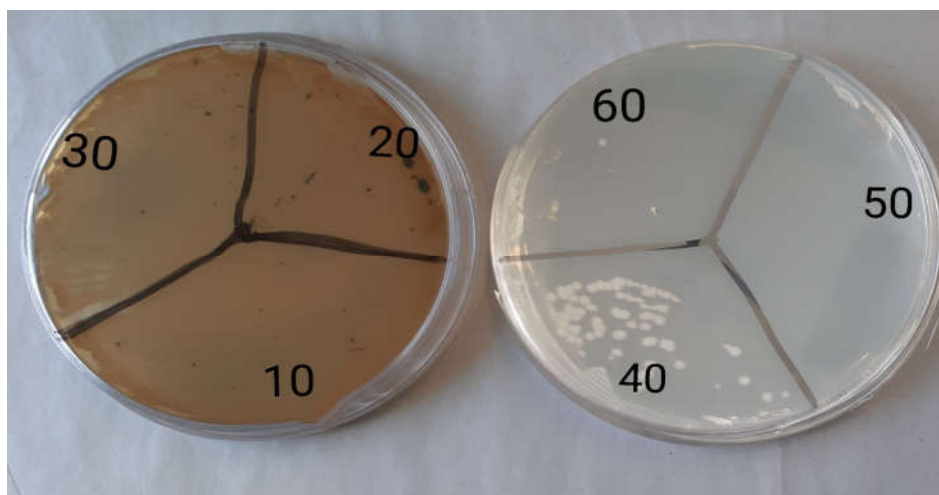
نتایج اثردهی باکتری و آنتی بیوتیک و نانوسیال حاوی نانولوله های کربنی به صورت هم‌زمان نشان داد که در سویه پاتوژن در رقت (۰/۰۸ mg/mL) ۴۰ μL نانوسیال حاوی نانولوله های کربنی به همراه رقت (۰/۱۲ mg/mL) ۱/۸ آنتی بیوتیک عدم رشد مشاهده شد (شکل ۷). در سویه استاندارد در هیچ یک از رقت‌ها رشد مشاهده نشد.

بحث

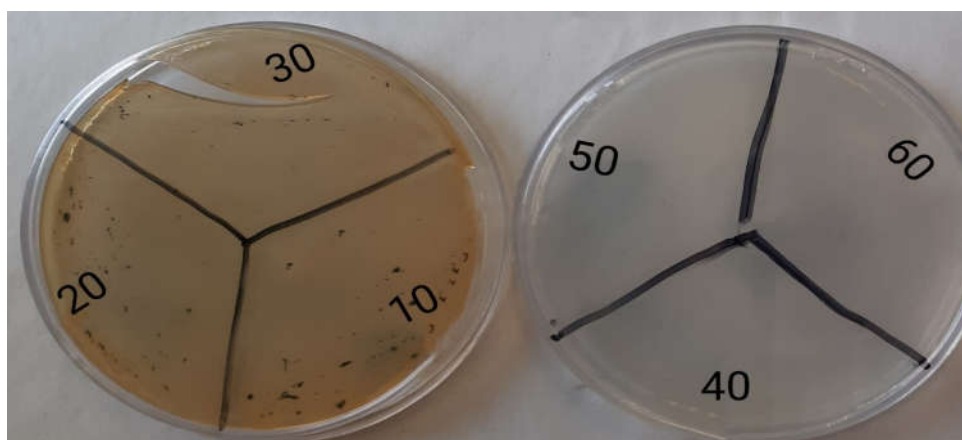
سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی فرصت طلب است و عامل اغلب عفونت های بیمارستانی بعد از *E.coli* و *Staphylococcus aureuse* است. این باکتری به دلیل مقاومت بالا نسبت به انواع مختلف آنتی بیوتیک‌ها به سختی درمان می‌شود (۲۰). در این تحقیق اثرات ضد باکتریایی قابل توجهی با استفاده از نانوسیال عامل‌دار حاوی نانولوله‌های کربنی و آنتی‌بیوتیک مروپنم ملاحظه شد. نانوسیال حاوی نانولوله‌های کربنی پتانسیل بیشتری از جمله نفوذ بهتر به غشای باکتریایی، افزایش بازده در غلظت‌های پایین‌تر از



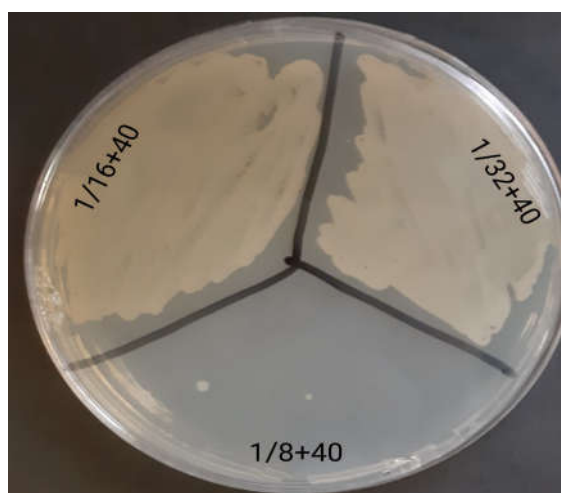
شکل ۴. نتایج اثردهی آنتی بیوتیک (مروپنم) بر روی باکتری استاندارد. در رقت ۱/۸ کاهش رشد محسوس مشاهده شد و در رقت‌های ۱/۱۶ و ۱/۳۲ رشد کامل و در رقت‌های بالاتر از ۱/۴ و ۱/۲ عدم رشد کاملاً مشاهده شد.



شکل ۵. نتایج اثردهی نانوسیال حاوی نانولوله‌های کربنی بر روی باکتری پاتوژن. در رقت‌های ۱۰ تا ۳۰ رشد باکتری مشاهده، در رقت ۴۰ کاهش محسوس رشد؛ و رقت‌های بالاتر از ۵۰ عدم رشد کاملاً مشاهده شد.



شکل ۶. اثردهی نانوسیال حاوی نانولوله‌های کربنی بر روی باکتری استاندارد. در رقت ۱۰ تا ۳۰ رشد مشاهده شد. در رقت بالاتر از ۴۰ عدم رشد کاملاً محسوس است.



شکل ۷. نتایج اثردهی آنتی بیوتیک (مروپنم) و نانوسیال حاوی نانولوله‌های کربنی بر روی باکتری پاتوژن. در رقت‌های ۴۰ + ۱/۳۲ و کمتر رشد مشاهده شد. در رقت ۴۰ + ۱/۸ عدم رشد به صورت محسوس قابل مشاهده است.

دوزهای معمول درمانی و کاهش مقاومت باکتری نسبت به فرم معمول آنتی بیوتیک‌ها دارد. این مطالعه با هدف دستیابی به اثر ضد باکتریایی نانوسیال حاوی نانولوله‌های کربنی و همچنین بهبود سطح عملکردی مروپنم در حضور نانوسیال حاوی نانولوله‌های کربنی انجام شد. مطالعات متعددی اثرات ضد باکتریایی نانوذرات مختلف از جمله نقره و طلا را مورد بررسی قرار داده‌اند (۲۱-۲۳). در یک مطالعه در سال ۲۰۰۸ گزارش شد که اندازه (قطر) نانولوله‌های کربنی (CNTs) یک عامل اصلی حاکم بر اثرات ضد باکتریایی آنهاست و احتمالاً مکانیسم اصلی سمیت سلولی CNTs آسیب غشای سلول در اثر تماس مستقیم با CNTs است (۲۴). در یک تحقیق دیگر اثرات ضد باکتریایی نانولوله‌های چند جداره MWCNTs به همراه اسید آمینه آرژنین و لیزین مورد بررسی قرار گرفت که به دلیل میزان سمیت کمتر نانولوله‌های کربنی چند جداره MWCNTs نسبت به نوع دیگر آن یعنی نانولوله‌های تک جداره SWCNTs باعث عملکرد بالای اسید آمینه‌های

کاتیونی و همچنین افزایش فعالیت ضد باکتریایی آن شد (۲۵). در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۲۰ اثرات نانولوله‌های کربنی چند جداره عامل‌دار شده با داروی ایزونیاژید بر روی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج در این تحقیق نشان داد که نانولوله‌های کربنی چند جداره عامل‌دار شده با ایزونیاژید اثرات ضد میکروبی را در دوزهای پایین نسبت به دوزهای معمول دارو به حالت آزاد را از خود نشان دادند (۱۸). این مطالعه برای ارزیابی اثرات ضد باکتریایی نانوسیال حاوی نانولوله‌های کربنی چند جداره و همچنین کمک به بالا بردن سطح عملکردی آنتی بیوتیک و تلاش برای استفاده از دوزهای پایین آنتی بیوتیکی انجام شده است. برای استفاده از این روش و به دست آوردن نتایج بهتر مطالعات بیشتری، از جمله ترکیب نانولوله‌های کربنی و آنتی بیوتیک و همچنین بررسی مطالعات سلولی و مولکولی بیشتر برای شناسایی مکانیسم‌های اثرات ضد باکتریایی مورد نیاز است.

REFERENCES

1. Trostrup H, Lerche CJ, Christophersen LJ, Thomsen K, Jensen PO, Hougen HP, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm hampers murine central wound healing by suppression of vascular epithelial growth factor. *Int Wound J* 2018;15:123-32.
2. Maurice NM, Bedi B, Sadikot RT. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Host Response and Clinical Implications in Lung Infections. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2018;58:428-439.
3. Imani Fooladi A, Sattari M, Pourbabaei AA, Gholami M. Relation between quinolones and beta-lactams resistance with feature of producing capsules in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urine. *J Med Sci* 2009;19:97-103.
4. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, et al. Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clin Microbiol Rev* 2019; 28;32:e00031-19.
5. Motbainor H, Bereded F, Mulu W. Multi-drug resistance of blood stream, urinary tract and surgical site nosocomial infections of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* among patients hospitalized at Felegehiwot referral hospital, Northwest Ethiopia: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2020;20: 92.
6. Pachori P, Gothwal R, Gandhi PJG. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *diseases* 2019;6:109-19.
7. Tartof SY, Kuntz JL, Chen LH, Wei R, Puzniak L, Tian Y, et al. Development and Assessment of Risk Scores for Carbapenem and Extensive β -Lactam Resistance Among Adult Hospitalized Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *JAMA Netw Open* 2018 5;1:e183927.
8. Orgensen SCJ, Rybak MJ. Meropenem and Vaborbactam: Stepping up the Battle against Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Pharmacotherapy* 2018;38:444-461.
9. Mikhail S, Singh NB, Kebriaei R, Rice SA, Stamper KC, Castanheira M, et al. Evaluation of the Synergy of Ceftazidime-Avibactam in Combination with Meropenem, Amikacin, Aztreonam, Colistin, or Fosfomycin against Well-Characterized Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; 25;63:e00779-19.
10. Dugal S, Fernandes A. Carbapenem Hydrolysing Metallo- β -Lactamases. *International Journal of Current Pharmaceutical Research* 2011;3:9-16.
11. Ebrahimzadeh Shiraz T, Rezaei Yazdi H, Alijanianzadeh M. Evaluation of Carbapenemase resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae family isolated from clinical specimens by using phenotypic methods in 2014-2015. *Pars of Jahrom Uni Med Sci* 2016;14:8-15. [In Persian]

12. Liao S, Zhang Y, Pan X, Zhu F, Jiang C, Liu Q, et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Nanomedicine* 2019; 25;14:1469-1487.
13. Eleraky NE, Allam A, Hassan SB, Omar MMJP. Eleraky NE, Allam A, Hassan SB, Omar MM. Nanomedicine Fight against Antibacterial Resistance: An Overview of the Recent Pharmaceutical Innovations. *Pharmaceutics* 2020;12:142.
14. He H, Pham-Huy LA, Dramou P, Xiao D, Zuo P, Pham-Huy CJBri. Carbon nanotubes: applications in pharmacy and medicine. *Biomed Research J* 2013;2013.
15. Bains D, Singh G, Bhinder J, Agnihotri PK, Singh N. Ionic Liquid-Functionalized Multiwalled Carbon Nanotube-Based Hydrophobic Coatings for Robust Antibacterial Applications. *ACS Appl Bio Mater* 2020;3:2092-103.
16. Liu D, Luo J, Wang H, Ding L, Zeng XA. Synthesis of Dihydromyricetin Coated Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) and Antibacterial Activities. *J Nanosci Nanotechnol* 2020;1;20:6148-6154.
17. Silva MA, Felgueiras HP, de Amorim MTP. Carbon Based Membranes with Modified Properties: Thermal, Morphological, Mechanical and Antimicrobial. *Cellulose* 2020 ;27:1497-1516.
18. Zomorodbakhsh S, Abbasian Y, Naghinejad M, Sheikhpour M. The Effects Study of Isoniazid Conjugated Multi-Wall Carbon Nanotubes Nanofluid on *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Nanomedicine* 2020;15:5901-9.
19. Cusack T, Ashley E, Ling C, Rattanavong S, Roberts T, Turner P, et al. Impact of CLSI and EUCAST breakpoint discrepancies on reporting of antimicrobial susceptibility and AMR surveillance. *Clin Microbiol Infect* 2019;25:910-911.
20. Chen S, Li R, Cheng C, Xu JY, Jin C, Gao F, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection alters the macrophage phenotype switching process during wound healing in diabetic mice. *Cell Biol Int* 2018;42:877-889.
21. Krishnan N, Velramar B, Ramatchandirin B, Abraham GC, Duraisamy N, Pandiyan R, et al. Effect of biogenic silver nanocubes on matrix metalloproteinases 2 and 9 expressions in hyperglycemic skin injury and its impact in early wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2018;91:146-152.
22. Ahmed R, Tariq M, Ali I, Asghar R, Noorunnisa Khanam P, Augustine R, et al. Novel electrospun chitosan/polyvinyl alcohol/zinc oxide nanofibrous mats with antibacterial and antioxidant properties for diabetic wound healing. *Int J Biol Macromol* 2018;120:385-393.
23. Yuan YG, Peng QL, Gurunathan S. Effects of Silver Nanoparticles on Multiple Drug-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from Mastitis-Infected Goats: An Alternative Approach for Antimicrobial Therapy. *Int J Mol Sci* 2017;6;18:569.
24. Kang S, Herzberg M, Rodrigues DF, Elimelech M. Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! *Langmuir* 2008;24:6409-13.
25. Zardini HZ, Amiri A, Shanbedi M, Maghrebi M, Baniadam M. Enhanced antibacterial activity of amino acids-functionalized multi walled carbon nanotubes by a simple method. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012;92:196-202.