



Scan online to view this article

The effect of silver nanoparticles on *mecA* gene expression in methicillin-resistant samples of *Staphylococcus aureus*

Ahmad Rashid, Farahnaz Molavi*, Homa Mahmoudzadeh

Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Abstract

Aim and Background: *Staphylococcus aureus* is a common cause of nosocomial infections and increased resistance to antimicrobial agents in this bacterium is one of the major problems in health care. We also see resistant strains of this bacterium that are important pathogens in the development of the disease. The control of these bacteria is very important from a health and economic point of view, so the aim of this study was to investigate the prevalence of methicillin *mecA* resistance gene and determine the pattern of antibiotic resistance in existing samples of *Staphylococcus aureus* and to evaluate the antibacterial activity of silver nanoparticles against Gram-positive *Staphylococcus aureus*.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, 59 *staphylococcus aureus* specimens were collected from 11 nature detection laboratories. These samples were identified using standard laboratory methods and specific culture. PCR was used to evaluate the frequency of *mecA* gene. In order to use the antibiotic susceptibility pattern of the strains, the disk diffusion method is performed based on the CLSI protocol. Silver nanoparticles were made from ginger extract and Real Time PCR was used to evaluate the effect of silver nanoparticles on *mecA* gene expression.

Results: Out of 59 samples of *Staphylococcus aureus*, 51 samples were resistant to methicillin. Phenotypic evaluation of antibiotic resistance pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains showed that the results showed that 90% of isolates to penicillin, 85% to erythromycin, 84% to ceftriaxone, 53% to amikacin, 49% to gentamicin, 47% to piracyl 45% were resistant to spirofloxacin 37% to imipetmo 35% to linezolid, ie the highest antibiotic resistance was to penicillin 90%, erythromycin 85% and the lowest to imipetmo 37% and linzolid 35, respectively. Molecular analysis showed the presence of *mecA* gene in all samples. The results of real-time study showed that the effect of nanoparticles on *mecA* gene expression is significant.

Conclusion: The presence of 51 resistant samples out of 59 samples in the present study indicates an increase in resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to other antibiotics, which is a serious warning for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections. And the effectiveness of silver nanoparticles on *mecA* gene expression shows that we can use this substance instead of existing antibiotics.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Methicillin, silver nanoparticles, antibiotic resistance, *mecA* gene

Corresponding author:

Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
Email: farahmolavi@gmail.com



برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

بررسی اثر نانوذرات نقره بر روی بیان ژن *mecA*

در نمونه های مقاوم به متی سیلین باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

احمد رشید، فرخناز مولوی*، هما محمودزاده

گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: باکتری استافیلوکوکوس اورئوس یک عامل شایع در عفونت های بیمارستانی است و افزایش مقاومت به عوامل ضد میکروبی در این باکتری یکی از مشکل هی عمدۀ بخش مراقبت های بهداشتی است همچنانی ما شاهد سویه های مقاوم شده این باکتری هستیم که پاتوژن های مهم در بروز بیماری و مرگ و میر هستند لذا کنترل این باکتری ها از نظر بهداشتی و اقتصادی اهمیت زیادی دارند. هدف از این تحقیق، بررسی میزان شیوع ژن مقاومت به متی سیلین *mecA* و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در نمونه های موجود استافیلوکوکوس اورئوس و بررسی فعالیت ضرباً کتریابی نانوذرات نقره علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس است.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی - توصیفی ۵۹ استافیلوکوکوس اورئوس از ۱۱ آزمایشگاه تشخیص طبی جمع آوری گردید. این نمونه ها با استفاده از روش های استاندارد آزمایشگاهی و کشت اختصاصی تعیین هویت شدند. برای بررسی فراوانی ژن *mecA* از روش PCR استفاده شد. به منظور ارزیابی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی سویه ها، از روش انتشار دیسک بر اساس پروتکل CLSI انجام گردید. نانوذره نقره توسط عصاره زنجبل ساخته شد و برای بررسی اثر نانوذره نقره بر بیان ژن *mecA* از روش Real time PCR استفاده شد.

یافته ها: از ۵۹ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم ۵۱ نمونه به متی سیلین بودند. ارزیابی فوتیپی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین نشان داد که ۹۰ درصد جدایه ها به پنی سیلین، ۸۵ درصد به اریترومایسین ۸۴ درصد به سفتیراکسون ۵۳ درصد به آمیکاسین، ۴۹ درصد به جنتامایسین، ۴۷ درصد به پیراسیلین، ۴۵ درصد به سپیروفلوكسازین ۳۷ درصد به ایمی پتمو ۳۵ درصد به لینزولید مقاومت داشتند یعنی بیش ترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی به ترتیب متعلق به پنی سیلین ۹۰ درصد، اریترومایسین ۸۵ درصد و کم ترین نسبت به ایمی پتمو ۳۷ درصد و لینزولید ۳۵ بود. بررسی مولکولی نشان دهنده حضور ژن *mecA* در تمام نمونه ها بود. و نتیجه بررسی ریل تایم نشان داد که تأثیر نانوذره بر روی بیان ژن *mecA* معنادار است ($P<0.01$).

نتیجه گیری: وجود ۵۱ نمونه مقاوم از ۵۹ نمونه در مطالعه حاضر نشان دهنده افزایش مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین نسبت به سایر آنتی بیوتیک های مختلف بوده که این مسئله یک هشدار جدی درمان عفونت های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس است. و مؤثر بودن نانوذره نقره بر بیان ژن *mecA* نشان می دهد که به این ماده می توان به عنوان یک جایگزین برای آنتی بیوتیک های موجود فکر کرد.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، متی سیلین، نانوذره نقره، مقاومت آنتی بیوتیکی، ژن *mecA*

مقدمه

نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

پست الکترونیکی: farahmolavi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۲

می‌کند که میل پیوندی پایینی برای آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام دارد. لازم است بدانید که پروتئین‌های PBP در ساخت و ساز دیواره سلولی باکتریایی نقش دارند. از این‌رو، وجود چنین پروتئین جدیدی تحت تأثیر آنتی‌بیوتیک نخواهد بود و باکتری به راحتی به زندگی خود ادامه می‌دهد. این سویه‌ها در اصطلاح استافیلوکوکوس‌های مقاوم به متی‌سیلین نامیده می‌شوند. نانوذرات گروهی از اتم‌ها، یون‌ها یا مولکول‌هایی هستند که اندازه آن‌ها بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر باشد و به‌دلیل کوچکی سایز قادر هستند که در شکاف‌های مولکول‌های کوچک نفوذ کنند و ایجاد گستگی در آن‌ها نمایند^(۶) لذا نانوذرات را می‌توان نسل جدیدی از آنتی‌بیوتیک‌های آینده به حساب آورد^(۷). هدف از تحقیق پیش‌رو شناسایی ژن *mecA* و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بررسی اثر نانوذره بر روی بیان ژن *mecA* است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه که به صورت توصیفی-مقطوعی^۶ و در یک بازه زمانی ۷ ماهه (۱۳۹۸-۱۳۹۹) انجام شد، تعداد ۵۹ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس از ۱۱ آزمایشگاه سطح شهر مشهد جمع آوری شد. پس از انتقال سویه‌ها که بر روی محیط آگار، کشت داده شده بود به آزمایشگاه تحقیقات گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، جهت شناسایی نمونه‌ها از تست‌های استاندارد شامل رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، کواگولاز DNase و لامی، رشد در مانیتول سالت آگار و استفاده شد^(۸). باکتری استافیلوکوکوس اورئوس استاندارد (ATCC=25923) از آزمایشگاه استاندارد ایران تهیه شد.

به منظور بررسی مقاومت به متی‌سیلین و الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی از محیط مولر هینتون آگار و روش انتشار دیسک در آگار استفاده شد^(۹). دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استفاده شده در این مطالعه شامل: پنی‌سیلین ۱، ۲۰ µg، سیپروفلوکساسین ۱، ۳۰ µg، لینزولید ۲۰ µg، اریتروماسین ۱۰ µg، جنتاماسین ۱۰ µg و sectional-Cross

استافیلوکوکوس اورئوس^۱ که به استافیلوکوکوس طلایی نیز شهرت دارد یک کوکسی گرم مثبت و بی-هوازی اختیاری است و از نظر پزشکی مهم‌ترین گونه این جنس محسوب می‌شود^(۱) استافیلوکوکوس اورئوس ممکن است در حالت عادی روی پوست انسان یا سایر پستانداران یک همزیست باشد که در این حالت عفونت ایجاد نمی‌کند^(۲). ولی اگر پوست آسیب ببیند این باکتری می‌تواند به بافت‌ها نفوذ کرده و عفونت‌های شدیدی ایجاد کند. این باکتری یکی از عوامل اصلی بیماری‌زا در انسان محسوب شود به‌طوری‌که در حال حاضر یک نگرانی عمده برای سلامت عمومی جامعه محسوب می‌شود که می‌تواند با درگیر گردن قسمت‌های مختلف بدن از جمله دستگاه تنفس باعث صرف هزینه‌های فراوان و طولانی شدن دوره درمان بیمار شود^(۳). هم‌چنین این باکتری سبب بیماری‌های خط‌ناک از جمله زرد زخم تاولی، سندروم فلسفی شدن پوست^۲، سندروم رایتر و سندروم شوک توکسیک^۳ به‌ویژه در کودکان و افرادی که ضعف سیستم ایمنی دارند، می‌شود^(۴). از مهم‌ترین مشکلات در درمان عفونت‌های استافیلوکوکی بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی و پتانسیل کسب ژن‌های خارجی در جهت بروز این مقاومت‌ها در آن‌ها است بنابراین سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس یا MRSA^۴ تهدید جدی در کنترل عفونت‌های اکتسابی از بیمارستان و جامعه به‌شمار می‌آیند و روند درمان عفونت‌های این باکتری را با مشکل مواجه می‌سازند^(۵). مقاومت به متی‌سیلین و سایر پنی‌سیلین‌های مقاوم به پنی‌سیلیناز به‌دلیل اپرون *mec* است. این اپرون، بخشی از کاست کروموزومی استافیلوکوکی^۵ است. ژن *mecA*، پروتئین متصل شونده به پنی‌سیلین با نام PBP2a را کد

¹ *Staphylococcus aureus*

² syndrome skin Scalded

³ TST

⁴ Methicillin Resistant Staphylococcus aureus

⁵ SCCmec

دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با پنس استریل در سطح محیط قرار گرفت به طوری که فاصله دیسک‌ها از لبه پلیت ۱/۵ سانتی‌متر و نسبت به هم ۲/۵ سانتی‌متر بود. سپس پلیت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از این مدت اطراف دیسک‌ها از لحاظ هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفتند (قطر ناحیه اطراف دیسک توسط خط کش مخصوص^۱ اندازه‌گیری و با مراجعه به جداول کمیته ملی معیارهای آزمایشگاهی بالینی^۲ حساسیت یا مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های رایج تعیین گردید. در نهایت پس از ۲۴ ساعت انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حداقل غلظت بازدارندگی رشد^۳ باکتری تعیین شد. برای این منظور همانند روش دیسک دیفیوژن سوسپانسیونی تهیه شده و کدورت آن را برابر با نیم‌مک فارلنده قرار داده و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت سفره‌ای داده شد.

استخراج RNA

استخراج RNA بعد از تیماردهی سوسپانسیون باکتری دارای ژن *meca* با نانوذره نقره (با رقت بعد از حداقل غلظت بازدارندگی رشد) انجام شد. استخراج RNA با استفاده از کیت مخصوص (۵۲۹۲) شرکت پارس طوس زیست فناور، انجام و پس از آن غلظت و جذب نوری تمامی RNA‌های استخراج شده با کمک نانوراپ Bio Tek Epoch، (Nanodrop Bio Tek Epoch, USA) اندازه‌گیری شد.

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

PCR ژن *meca*

^۱ Antibiotic Zone Scale ruler

^۲ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)

^۳ Minimum Inhibitory of Concentration: MIC

۲ μ g، ایمی‌بی‌تمو ۵ μ g و سفوکسیتین ۳۰ μ g بود که از شرکت پادتن طب تهیه شد. این مرحله براساس دستورالعمل استاندارد آزمایشگاه (۱۰) انجام شد.

ساخت نانوذره نقره

۵ گرم زنجیبل آسیاب شده را در ۵۰ سی‌سی آب مقطّر حل کرده (در این روش برای هر گرم پودر گیاه ۱۰ سی‌سی آب مقطّر استریل اضافه می‌شود) و ۱۵ دقیقه جوشیده شد. بعد محلول در ویال ۵۰ میلی-لیتری ریخته شد و ۱۲ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ، محلول فوقانی به یک پلیت منتقل گردید و پس از فیلتر شدن این محلول در ۲۰ سانتی‌متری آتش، ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره فیلتر شده زنجیبل را در ویال ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و ۱۰ میکرولیتر از محلول نیترات نقره ۱ میلی‌مولار به آن اضافه شد. بعد از تغییر رنگ، محلول در میکروتیوب-های ۲ میلی‌لیتری ریخته شده و با دور ۱۴۰۰۰ بدست ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی دور ریخته شد و ۲ میلی‌لیتر آب دیونیزه یا آب مقطّر به آن اضافه گردید و مجدد سانتریفیوژ شد بعد ۳ بار تکرار این مرحله، رسوب انتهایی را در پلیت‌های جداگانه ریخته و در محل تاریک گذاشته تا خشک شود و پودر نانوذره آماده گردد. برای بررسی خصوصیت فیزیکی نانوذره به دست آمده از روش‌های عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری (دانشگاه فردوسی مشهد)، FTIR (دانشگاه آزاد واحد مشهد) و دستگاه طیف سنج پراش پرتو ایکس XRD (دانشگاه فردوسی مشهد) استفاده شد.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی

برای این منظور نمونه‌ها با استفاده از دیسک دیفیوژن در محیط جامد یا روش کربی بائر و طبق دستورالعمل استاندارد CLSI بررسی شدند (۱۱) برای این منظور، از باکتری‌های رشد کرده سوسپانسیونی معادل ۰/۵ مکفارلنند تهیه گردید و بر روی محیط مولر هینتون آگار به صورت کشت سفره‌ای کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند تا باکتری‌ها با شرایط جدید سازگاری یابند. پس از آن

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از کیت مخصوص RealQ دنا زیست (مستر میکس سایبرگرین ریل تایم Plus 2x Master Mix Green) به صورت زیر انجام شد: ۱۰/۵ میکرولیتر از مستر میکس، پرایمر رفت ۱۰ میکرومولار به مقدار ۵/۰ میکرولیتر، پرایمر برگشت ۱۰ میکرومولار به مقدار ۵/۰ میکرولیتر، نمونه ۵ نانوگرم cDNA و آب فاقد نوکلئاز تا رساندن حجم تا ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. تکثیر قطعه‌ای موردنظر در دستگاه Applied Biosystems StepOnePlus با برنامه واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه، تکثیر شامل واسرشت در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۴۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن sRNA ۱۶ به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. برای محاسبه میزان بیان نسبی ژن، آنالیز داده‌ها و رسم نمودارهای LightCycler Relative Quantification Software مربوطه از ۲ΔΔCT با روش *mecA* با روشن فرض کارایی ۱۰۰ درصد و با استفاده از آزمون آماری T مستقل در دو گروه آنالیز شد.

جدول ۱: توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای استفاده شده در تکثیر ژن *mecA* در استافیلوکوکوس اورئوس و ژن ۱۶S rRNA (۱۲)

ژن	توالی نوکلئوتیدی
<i>mecA</i>	F: AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC R: AGTTCTGCAGTACCGGATTGTC
16S rRNA	F:CCCAACCCTTTCTTACTTGC R:CATCAACTTCACCTCACGC

نتایج

در این مطالعه مقطعی توصیفی ۵۹ نمونه مورد بررسی قرار گرفت و شناسایی آن‌ها توسط تست‌های تشخیصی میکروبیولوژی و بیوشیمیایی تأیید شدند و از بین آن‌ها ۵۱ نمونه‌ها دارای ژن *mecA* بودند و از لحاظ فنوتیپی به متی‌سیلین مقاومت نشان دادند. شکل شماره ۱ نتیجه محصول PCR ژن *mecA* بعد از انجام الکتروفورز است. وجود باند ۱۹۸ جفت بازی *mecA* نشان‌دهنده مثبت بودن از نظر وجود ژن *mecA* است.

پس از BLAST پرایمرهای سنتز شده توسط نرم-افزار اولیگو (oligo 7.60) در سایت NCBI ، واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. در این واکنش، ۱ میکرولیتر از cDNA الگو، ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA Polymerase ۵ واحد در میکرولیتر، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۰/۵ پیکومول در میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر از مخلوط دزوکسی ۲/۵ نوکلئوتیدهای تری‌فسفات (۰/۵ میلی‌مolar)، ۰/۵ میکرولیتر بافر PCR (۰/۱۰ M)، ۱/۵ میکرولیتر از نمک MgCl₂ (۰/۵ میلی‌مolar) با یکدیگر مخلوط شده، حجم نهایی با آب دوبار تقطیر شده به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. واکنش در ۳۳ سیکل با برنامه دمایی، دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۶ دقیقه برای ۳۴ سیکل در شرایط زیر عبارتند از؛ واسرشته شدن^۱ ۹۵ درجه سلسیوس ۵ دقیقه، اتصال پرایمر^۲ ۵۷ درجه برای ۵۰ ثانیه، طویل شدن^۳ ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس برای ۶ دقیقه انجام شد.

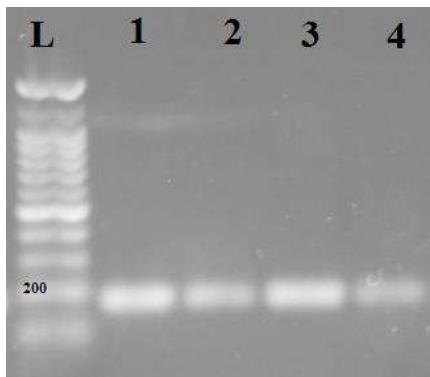
جهت بررسی کیفیت محصول PCR، محصول بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز در بافر TBE به مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز شد (۱۲). برای رنگ آمیزی ژل، آنرا به مدت ۱۵ دقیقه در تانک حاوی اتیدیوم بروماید قرار داده و نتایج را توسط دستگاه Geldocument با نور فرابنفش مورد مطالعه قرار گرفت. از نشانگر Cat. No. PR911653.100bp شرکت سیناکلون برای تخمین اندازه قطعه‌ها استفاده شد. میزان تغییر بیان ژن با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 و آزمون One way ANOVA تجزیه و تحلیل شد در تمام موارد سطح معنی‌داری <0.01 در نظر گرفته شد.

سنجهش بیان ژن توسط تکنیک TimePCR

^۱ Denaturation

^۲ Annealing

^۳ Extension



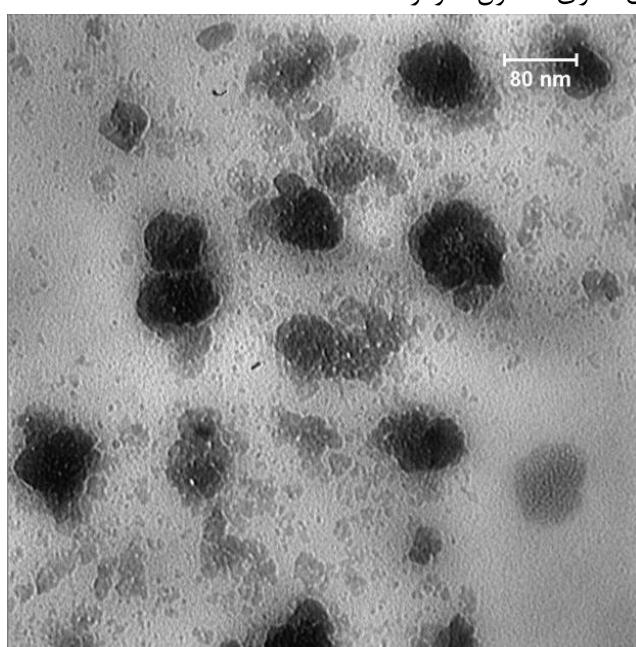
شکل ۱: نتایج الکتروفورز حاصل تکثیر ژن *mecA* (از چپ به راست: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، کنترل مثبت، نمونه‌های مثبت حاوی ژن *mecA*، طول قطعه موردنظر ۱۹۸ جفت باز است)

تعیین حساسیت میکروبی

نتایج نشان داد ۹۰ درصد جدایه‌ها به پنی‌سیلین، ۸۵ درصد به اریترومایسین ۸۴ درصد به سفتیریاکسون ۵۳ درصد به آمیکاسین، ۴۹ درصد به جنتامایسین، ۴۷ درصد به پیراسیلین، ۴۵ درصد به سپیروفلوکسازین ۳۷ درصد به ایمی‌پتمو ۳۵ درصد به سلفامتوکسازول مقاومت داشتند یعنی بیشترین میزان مقاومت آنتی-بیوتیکی به ترتیب متعلق به پنی‌سیلین (۹۰درصد)، اریترومایسین ۸۵٪ و کمترین لینزولید بود.

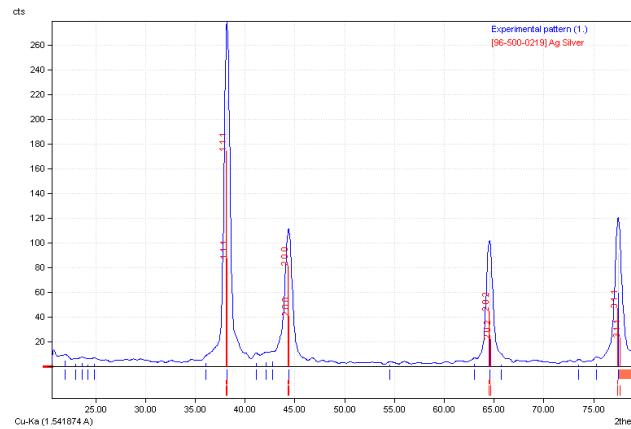
بررسی خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره

فعالیت ضدمیکروبی نانوذره نقره تولیدی اکثرا شکل مکعبی با اندازه ۲۲/۳۹ تا ۹۳/۳۵ نانومتر و تعداد بسیار کمی به صورت مثلثی و میله‌ای هستند(شکل ۲).



شکل ۲: تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از نانوذره نقره ساخته شده

۷۸/۸^۰ بوده که وجود نانوکریستال های نقره را ثابت می کند. همچنین نتایج نشان داد که اکثر نانوذرات شکل مکعبی داشتند و ۴ پیک جذبی در آن ها تشخیص داده شد (شکل ۳).



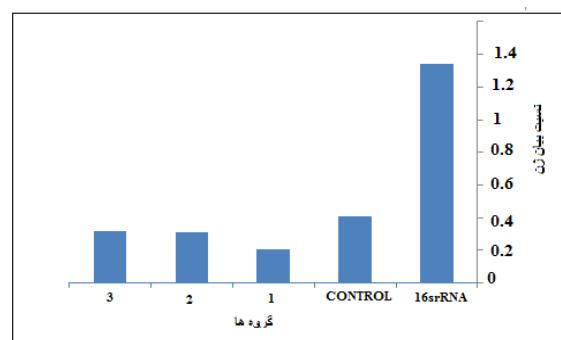
شکل ۳: الگوی پراش اشعه ایکس بر نانوذره نقره ساخته شده در پژوهش

و از نظر آماری تفاوت معناداری در مقایسه با بیان ژن 16S rRNA از خود نشان دادند ($P < 0.05$) (شکل ۴). منحنی ذوب تعیین کننده عدم جفت شدن آغازگرها، تکثیر اختصاصی قطعه های ژنی موردنظر و عدم تکثیر قطعه های غیراختصاصی برای هر ژن را در شکل ۵ نشان می دهد.

XRD مطالعه
بر اساس شکل ۳ الگوی پراش اشعه ایکس(xrd)، اندیس های میلر در سطوح ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۰۲ و ۳۱۱ بوده و به ترتیب مربوط به زاویه های $44/3^0$ ، $37/5^0$ ، $44/3^0$ ، $37/5^0$ و $44/3^0$ می باشد.

بیان ژن *mecA* بعد از تیمار با مهارکننده نانوذره نقره

برای مقایسه اثر نانوذره نقره بر بیان ژن *mecA* بعد از استخراج RNA و سنتز cDNA بیان ژن به صورت کمی با استفاده از روش Real Time PCR بررسی شد، نتایج این روش نشان داد که سویه های مختلف تحت تأثیر نانوذرات نقره تغییر بیان متفاوتی را داشتند

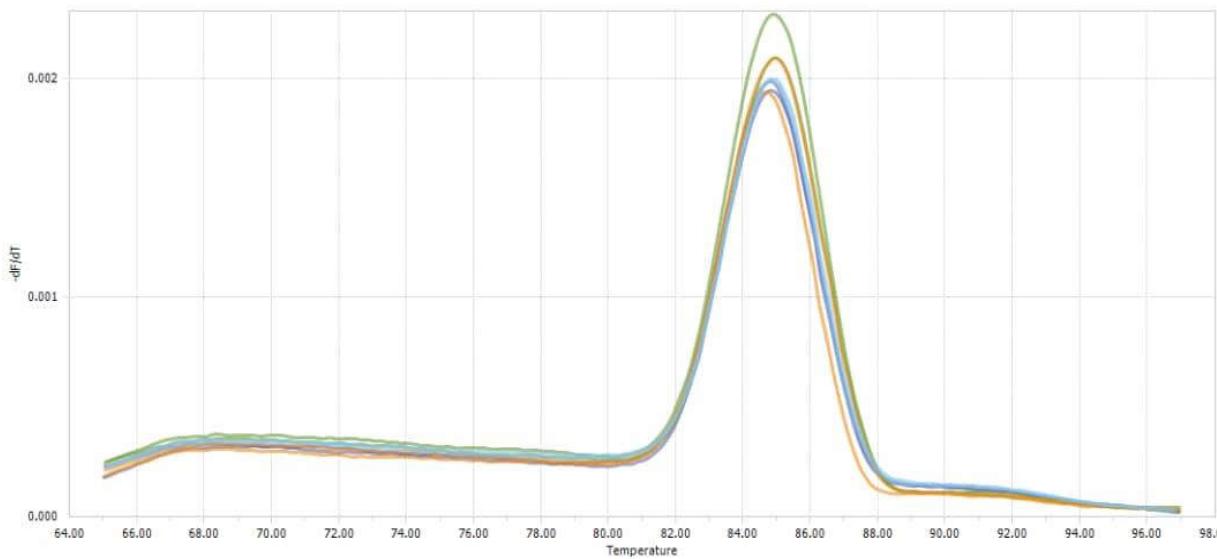


شکل ۴: میزان بیان ژن *mecA* در سویه های تیمار شده با نانوذرات نقره.

استافیلوکوکی استفاده می شد اما روز بروز به مقاومت آنتی بیوتیکی علیه پنی سیلین افزوده شد به طوری که در سال ۱۹۵۰، ۴۰ درصد سویه های بیمارستانی به پنی سیلین مقاوم شدند و این میزان در سال ۱۹۶۰ به ۸۰ درصد رسید. علت این پدیده تولید پنی سیلین از توسط باکتری بود که پنی سیلین را تجزیه می کند؛

بحث و نتیجه گیری

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از پاتوژن مطرح در سطح جهانی است و به عنوان دومین باکتری در ایجاد عفونت های بیمارستانی مطرح است. پس از کشف پنی سیلین، در ابتدا از این دارو برای درمان عفونت های



شکل ۵: آنالیز منحنی ذوب (Melting curve) برای اطمینان از اختصاصی بودن قطعه‌های تکثیر شده ژن *meca* که منحنی ژن مورد سنجش در تمام نمونه‌ها با هم منطبق و به صورت یک قله است.

سال ۲۰۱۸ (۱۸)، زمانی در سال ۲۰۰۷ (۱۹) و Moradi در سال ۲۰۱۱ (۲۰) نیز گزارش شده بود. همچنین Shokri و همکارانشان در سال ۱۳۹۳ با بررسی ۱۷۶ نمونه بالینی جمع‌آوری شده از بخش‌های مختلف بیمارستان آیت... موسوی زنجان، نشان دادند که کمابیش تمام نمونه‌های مورد مطالعه این بیمارستان دارای مقاومت به متی‌سیلین بودند (۲۱). این نتایج نشان می‌دهند که افزایش مقاومت به آنتی-بیوتیک همواره یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشت جهانی بوده است اینک به تهدیدی روزافزون مبدل گردیده و توسعه راهکاری جدید برای غلبه بر این مشکل نیازی حیاتی است.

یکی از راه‌های امیدوارکننده برای از بین بردن مقاومت‌های باکتریایی، استفاده از نانوذرات فلزی است (۲۲).

نانوذرات به دلیل اندازه کوچک و سطح تماس بالایی که با محیط و میکروارگانیسم‌ها دارند می‌توانند باعث افزایش فعالیت بیولوژیک و شیمیایی آن‌ها شوند. همین امر موجب می‌گردد که اثرهای ضدمیکروبی نانوذرات فلزی در مقایسه با خود فلزات بسیار بالاتر باشد. آن‌ها می‌توانند پس از ورود به سلول باکتریایی با تداخل در عملکرد پروتئین‌های حاوی سولفور و مولکول‌های دارای فسفر، نظیر DNA کارایی آن‌ها را از

بنابراین از آنتی‌بیوتیک‌های جدیدتر یعنی پنی-سیلین‌های مقاوم به پنی‌سیلیناز (مانند اکساسیلین و متی‌سیلین) استفاده شد (۱۳). بعد از آن نمونه‌های مقاوم به متی‌سیلین که MRSA نامیده می‌شوند گسترش یافته‌ند که به طور معمول به بیش‌تر آنتی-بیوتیک‌ها مقاوم هستند و در حال حاضر، سویه‌های استافیلکوکوس /ورئوس مقاوم به متی‌سیلین بسیار فراوان هستند و همچنان در حال گسترش هستند (۱۴) مطالعه‌های قبلی در شهر مشهد نیز نشان می‌دادند که مقاومت در این باکتری روند افزایشی داشته است (۱۵) ولی در سال‌های اخیر این روند سرعت بیش‌تری گرفته است (۱۶). در یک پژوهش گسترده و پنج ساله نشان داده شد که که فراوانی MRSA در سال ۱۹۹۶ تنها ۱/۷٪، در سال ۱۹۹۷ حدود ۰/۵٪، در سال ۱۹۹۸ نیز ۶/۵٪ بوده و این میزان در سال ۱۹۹۹ به بالاترین مقدار خود یعنی حدود ۶/۵٪ رسید (۱۷). افزایش گسترش مقاومت به متی‌سیلین از قبل پیش‌بینی شده بود و مطالعه‌هایی که در سال ۲۰۰۴ در ترکیه انجام شده بود نشان داده بود که این نوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در استافیلکوکوس /ورئوس به شدت در حال گسترش است (۱۸). مطالعه‌های داده است که اکثریت نمونه‌ای مورد بررسی این مقاومت را کسب کرده‌اند. فراوان بودن سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در ایران، در قبل توسط Jafaree-Sales در

این ژن می‌توانیم به منظور شناسایی مقاومت متی-سیلین در نمونه‌های استافیلیوکوکوس/ورئوس استفاده کنیم. هم راستا با نتیجه موجود Asgaree، با تأکید بر اپیدمیولوژی MRSA در ایران از بین ۷۴۶۴ مقاله استخراج شده از پایگاه‌های اطلاعاتی، نشان داد که ۹۵۰ سویه/استافیلیوکوکوس/ورئوس نشان داد که ۹۵ درصد از سویه‌ها دارای ژن *mecA* بودند البته فراوانی نسبی MRSA در مطالعه‌های مختلف بین ۲۰/۴۸٪ در اصفهان تا ۹۰٪ در تهران متغیر بود (۳۹).

در این پژوهش نانوذره نقره برای بررسی اثر ضدمیکروبی/استافیلیوکوکوس/ورئوس استفاده شد این انتخاب همسو با مطالعه Salmani و همکارانش در سال ۲۰۱۷ بود که بر روی بررسی فعالیت ضدبакتریایی نانوذرات نقره علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در محیط آزمایشگاهی مطالعه کردند و براساس نتایج حاصل از این مطالعه باکتری‌های /شرشیاکلای کمترین حساسیت و باکتری‌های /استافیلیوکوکوس/ورئوس بیشترین حساسیت را نسبت‌به نانوذرات نقره نشان دادند (۳۵).

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که نانوذره نقره می‌تواند گزینه‌ای باشد برای جلوگیری افزایش شیوع مقاومت در بین سویه‌های استافیلیوکوکوس/ورئوس لذا می‌تواند یک گزینه مناسب برای درمان عفونت‌های ناشی از استافیلیوکوکوس/ورئوس در بیمارستان و تغییر رویکرد درمانی باشد. این پیشنهاد در مطالعه Azadi و همکارانش در سال ۱۳۹۵ نیز ارائه شده است و آن‌ها ارتباط معنی‌داری بین MIC نانوذره نقره در ایزوله‌های استافیلیوکوکوس/ورئوس با منشاء جداسازی نمونه و مقاومت‌به متی‌سیلین و جنتامایسین را نشان دادند و ایراز کردند که با توجه‌به پایین بودن MIC نانوذره نقره بر ایزوله‌های مقاوم‌به متی‌سیلین، امکان استفاده از آن در کنترل MRSA در عفونت بیمارستانی می‌تواند مورد توجه بیشتر قرار گیرد (۴۰).

سیاستگزاری

بین ببرند (۲۳). در سال‌های اخیر، استفاده از نانوذرات فلزی به عنوان ترکیب‌های ضد اکتری روند رو به رشدی داشته است. از این میان نانوذرات نقره (۲۴)، اکسیدهای تیتانیوم (۲۵)، روی (۲۶)، مس (۲۷) و آهن (۲۹) به دلیل خواص ضدبacterی مناسب، بیش از سایر نانوذرات مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در خصوص اثر ضدمیکروبی نانوذرات بر روی استافیلیوکوکوس/ورئوس مطالعه‌های متعددی انجام شده است. Pishvaaee و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که نانوذره اکسید کروم نقش ضدمیکروبی روی این باکتری دارد (۳۱). اثر ضدمیکروبی نانوذره طلا و مس نیز بر روی استافیلیوکوکوس/ورئوس در سال ۱۳۹۶ توسط Nadi و همکارنش نشان داده شد (۳۲). اثر ضدمیکروبی نانوذره نیکل بر روی استافیلیوکوکوس/ورئوس نیز توسط Gahremani و همکاران در سال ۱۳۹۴ ارائه شده است (۳۳). در مطالعه حاضر زمان تماس نانوذره ۲۴ ساعت و غلظت نانوذره با روش استاندارد محاسبه گردید چرا که مطالعه Aasadi و همکاران نشان داد متغیرهای نوع باکتری، زمان تماس و غلظت نانوذرات نقره عوامل مؤثر بر بروز خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره است (۳۴).

نتیجه پژوهش حاضر نشان داد که این نانوذره می‌تواند اثر ضدمیکروبی روی این باکتری ایفا کند و این اثر را با کم کردن بیان ژن *mecA* ایفا می‌کند. اهمیت بیان ژن *mecA* در مقاومت این باکتری نسبت‌به متی‌سیلین در این باکتری است در مطالعه‌های متعددی گزارش شده است. Ramezanzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۵ در کردستان اعلام کردند که می‌توان با روش تکثیر ژن *mecA*، مقاومت باکتری‌ها را شناسایی کرد (۳۶). این تحقیق توسط Santosaningsih نیز تأیید شد (۳۷). لذا همان‌طور که کلیبی بیان کرده بود می‌توانیم مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها را بر اساس ژن *mecA* مقاومت آن‌ها شناسایی کنیم (۳۸). این تحقیق نیز با توجه‌به این که تمام نمونه‌های مقاوم‌به متی‌سیلین حامل ژن *mecA* بوده‌اند بیان می‌کند که از

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

1. V. M. Corman, J. Lienau, M. Witzenrath, [Coronaviruses as the cause of respiratory infections]. Internist (Berl) 60, 1136-1145 (2019).
2. Saeed Soleiman-Meigooni.Hospital Outbreak of Middle East Respiratory Syndrome CoronavirusThe new England journal of medicine, august 2013 ,1 vol. 369 no. 5
3. A. R. Fehr, R. Channappanavar, S. Perlman, Middle East Respiratory Syndrome: of a Pathogenic Human Coronavirus. Annu Rev Med 68, 387-399 (2017).
4. Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7> (2020).
5. World Health Organization. WHO Statement Regarding Cluster of Pneumonia Cases in Wuhan, China Geneva 2020 [updated 9 January 2020 and 14 January 2020]. Available from: <https://www.who.int/china/news/detail/09-01-2020> -who -statement regarding -cluster -of pneumonia -cases-in-wuhan-china.
6. Chinese Center for Disease Control and Prevention. Epidemic update and risk assessment of 2019 Novel Coronavirus 28 January 2020 [cited 29 January 2020]. Available from: <http://www.chinacdc.cn/yyrdgz/202001/P020200128523354919292.pdf>
7. Iranian Center for Disease Control and Prevention. Epidemic update and risk assessment of 2019 Novel Coronavirus 28 January 2020. www. Health.sbm.ac.ir https://www.who.int/csr/sars/biosafety2003_04_25/en
8. Chen, Y., Liu, Q. & Guo, D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. J. Med. Virol. <https://doi.org/10.1002/jmv.25681> (2020).
9. Montani JP, Vliet VB. General physiology and pathophysiology of the renin-angiotensin system. Angiotensin Vol. I: Springer; 2004: 3-29.
10. Hosseini khalili AR, Thompson J, Kehoe A, Hopkinson NS, et al. Angiotensin-converting enzyme genotype and late respiratory complications of mustard gas exposure. BMC Pulm Med. 2008;8(1):15.
11. Crisan D, Carr J. Angiotensin I-converting enzyme: genotype and disease associations. J of Mol Diagn. 2000; 2(3): 105.
12. Lu, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. Lancet. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8) (2020).
13. Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7> (2020).
14. Zhu, N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. N. Engl. J. Med. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2001017> (2020).
15. Xu, X. et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. Sci. China Life Sci. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1637-5> (2020).

16. Hao Xu. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. International Journal of Oral Science (2020) 12:8 ; <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>.
17. Hao Zhang et al. The digestive system is a potential route of 2019-nCov infection: a bioinformatics analysis based on single-cell transcriptomes. bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.01.30.927806>.
18. Jiahua He Huanyu Tao, Yumeng Yan, Sheng-You Huang*, Yi Xiao. Molecular mechanism of evolution and human infection with the novel coronavirus (2019-nCoV). bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.17.952903>.
19. Huang, C., et al., SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs: viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage. PLoS Pathog, 2011. 7(12): p. e1002433.
20. Tanaka, T., et al., Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 facilitates efficient propagation in cells through a specific translational shutoff of host mRNA. J Virol, 2012. 86(20): p. 11128-37.
21. Graham, R.L., et al., The nsp2 replicase proteins of murine hepatitis virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus are dispensable for viral replication. J Virol, 2005. 79(21): p. 13399-411.
22. Gadlage, M.J., R.L. Graham, and M.R. Denison, Murine coronaviruses encoding nsp2 at different genomic loci have altered replication, protein expression, and localization. J Virol, 2008. 82(23): p. 11964-9.
23. Lei, J., Y. Kusov, and R. Hilgenfeld, Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein. Antiviral Res, 2018. 149: p. 58-74.
24. Serrano, P., et al., Nuclear magnetic resonance structure of the nucleic acid-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 3. J Virol, 2009. 83(24): p. 12998-3008.
25. Beachboard, D.C., J.M. Anderson-Daniels, and M.R. Denison, Mutations across murine hepatitis virus nsp4 alter virus fitness and membrane modifications. J Virol, 2015. 89(4): p. 2080-9.
26. Gadlage, M.J., et al., Murine hepatitis virus nonstructural protein 4 regulates virus-induced membrane modifications and replication complex function. J Virol, 2010. 84(1): p. 280-90.
27. Stobart, C.C., et al., Chimeric exchange of coronavirus nsp5 proteases (3CLpro) identifies common and divergent regulatory determinants of protease activity. J Virol, 2013. 87(23): p. 12611-28.
28. Zhu, X., et al., Porcine Deltacoronavirus nsp5 Antagonizes Type I Interferon Signaling by Cleaving STAT2. J Virol, 2017. 91(10).
29. Angelini, M.M., et al., Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. mBio, 2013. 4(4).
30. Cottam, E.M., M.C. Whelband, and T. Wileman, Coronavirus NSP6 restricts autophagosome expansion. Autophagy, 2014. 10(8): p. 1426-41.

31. Kirchdoerfer, R.N. and A.B. Ward, Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors. *Nat Commun*, 2019. 10(1): p. 2342.
32. Zhai, Y., et al., Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7-nsp8 hexadecamer. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. 12(11): p. 980-6.
33. Te Velthuis, A.J., S.H. van den Worm, and E.J. Snijder, The SARS-coronavirus nsp7+nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both de novo initiation and primer extension. *Nucleic Acids Res*, 2012. 40(4): p. 1737-47.
34. Egloff, M.P., et al., The severe acute respiratory syndrome-coronavirus replicative protein nsp9 is a single-stranded RNA-binding subunit unique in the RNA virus world. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(11): p. 3792-6.
35. Zeng, Z., et al., Dimerization of Coronavirus nsp9 with Diverse Modes Enhances Its Nucleic Acid Binding Affinity. *J Virol*, 2018. 92(17).
36. Bouvet, M., et al., Coronavirus Nsp10, a critical co-factor for activation of multiple replicative enzymes. *J Biol Chem*, 2014. 289(37): p. 25783-96.
37. Ma, Y., et al., Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14-nsp10 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. 112(30): p. 9436-41.
38. Fang, S.G., et al., Proteolytic processing of polyproteins 1a and 1ab between non-structural proteins 10 and 11/12 of Coronavirus infectious bronchitis virus is dispensable for viral replication in cultured cells. *Virology*, 2008. 379(2): p. 175-80.
39. Ahn, D.G., et al., Biochemical characterization of a recombinant SARS coronavirus nsp12 RNA-dependent RNA polymerase capable of copying viral RNA templates. *Arch Virol*, 2012. 157(11): p. 2095-104.
40. Te Velthuis, A.J., et al., The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. *Nucleic Acids Res*, 2010. 38(1): p. 203-14.
41. Adedeji, A.O. and H. Lazarus, Biochemical Characterization of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Helicase. *mSphere*, 2016. 1(5).
42. Eckerle, L.D., et al., Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog*, 2010. 6(5): p. e1000896.
43. Jia, Z., et al., Delicate structural coordination of the Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus Nsp13 upon ATP hydrolysis. *Nucleic Acids Res*, 2019. 47(12): p. 6538-6550.
44. Bouvet, M., et al., Viral Disease Research & Therapeutic Development RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(24): p. 9372-7.
45. Minskaia, E., et al., Discovery of an RNA virus 3'→5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(13): p. 5108-13.
46. Bhardwaj, K., et al., RNA recognition and cleavage by the SARS coronavirus endoribonuclease. *J Mol Biol*, 2006. 361(2): p. 243-56.
47. Zhang, L., et al., Structural and Biochemical Characterization of Endoribonuclease Nsp15 Encoded by Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol*, 2018. 92(22).

48. Chen, Y., et al., Biochemical and structural insights into the mechanisms of SARS coronavirus RNA ribose 2'-O-methylation by nsp16/nsp10 protein complex. *PLoS Pathog*, 2011. 7(10): p. e1002294.
49. Decroly, E., et al., Crystal structure and functional analysis of the SARS-coronavirus RNA cap 2'-O-methyltransferase nsp10/nsp16 complex. *PLoS Pathog*, 2011. 7(5): p. e1002059.
50. Shi, P., et al., PEDV nsp16 negatively regulates innate immunity to promote viral proliferation. *Virus Res*.
51. Wong, D. W., Oudit, G. Y., Reich, H., Kassiri, Z., Zhou, J., Liu, Q. C., Scholey, J. W. (2007). Loss of angiotensin-converting enzyme-2 (Ace2 accelerates diabetic kidney injury. *The American Journal of Pathology*, 171(2), 438-451.
52. Zhang, H., Penninger, J. M., Li, Y., Zhong, N., & Slutsky, A. S. (2020). Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Medicine*, DOI: <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05985-9>
53. Fehr A.R., Perlman S. (2015) Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. In: Maier H., Bickerton E., Britton P. (eds) *Coronaviruses. Methods in Molecular Biology*, vol 1282. Humana Press, New York, NY.
54. Cai, G., Cui, X., Zhu, X., & Zhou, J. (2020). A Hint on the COVID-19 Risk: Population Disparities in Gene Expression of Three Receptors of SARS-CoV, *Preprints*, DOI: doi:10.20944/preprints202002. 0408.v1.
55. Zheng, Y. Y., Ma, Y. T., Zhang, J. Y., & Xie, X., (2020), COVID-19 and the cardiovascular system. *Nature Reviews Cardiology*, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0360-5>.
56. Wang, J., Luo, Q., Chen, R., Chen, T., Li, J., (2020), Susceptibility Analysis of COVID-19 in Smokers Based on ACE2. *Preprints*, DOI:10.20944/preprints202003. 0078.v1
57. Grayson Wick. *Coronavirus 2020, What is really happening and how to prevent it.* updated February 12 th , 2020.
58. Wenzhong Liu. COVID-19 Disease: ORF8 and surfscce glycoprotein inhibit Heme Metabolism by binding to Porphyrin. Scholl of Life Science, Yibin University 644000. liuwz@suse.edu.cn.
59. Diao, K., Han, P., Pang, T., Li, Y. & Yang, Z. HRCT Imaging Features in Representative Imported Cases of 2019 Novel Coronavirus Pneumonia. *Precision Clinical Medicine* (2020).
60. Chang, D. et al. Epidemiologic and clinical characteristics of novel coronavirus infections involving 13 patients outside Wuhan, China. *JAMA* (2020).
61. To Sing Fung and Ding Xiang Liu. Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. *Annual Review of Microbiology*. Annu. Rev. Microbiol. 2019. 73:529–57.
62. Masters PS. 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66:193–292.
63. LuoH,ChenQ,Chen J,Chen K, Shen X, JiangH. 2005. The nucleocapsid protein of SARS coronavirus has a high binding affinity to the human cellular heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1.*FEBS Lett.*579(12):2623–28.

64. Kristian G. Andersen^{1,2}, The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*. www.nature.com/naturemedicine. 17 MARCH 2020. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
65. Zhou, P. et al. *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7> (2020)
66. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020; 395(10223):497- 506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
67. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020; 395(10223):507-513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
68. Fang F, Luo X. Facing a major outbreak of new coronavirus infections in 2019: thoughts of pediatricians [J]. *Chinese Journal of Pediatrics*. 2020; 58(2):81-85. doi: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310. 2020.02.001.
69. Rodriguez-Morales AJ, MacGregor K, Kanagarajah S, Patel D, Schlagenhauf P. Going global - Travel and the 2019 novel coronavirus. *Travel Med Infect Dis*. 2020; 33:101578.
70. Khan S, Ali A, Siddique R, Nabi G. Novel coronavirus is putting the whole world on alert. *J Hosp Infect*. 2020. doi: 10.1016/j.jhin.2020.01.019

