NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.12/48 , 2022

Scan online to view this article

Evaluation of the effect of ionic liquids based on amino acid on the expression of pathogenic genes of Enterococcus faecalis strains isolated from the mouth

Parisa Bonyadi [1], Behrooz Shojaee saadi[1], Kumarss Amini[2*]

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran
2. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Abstract

Aim and Background: *Enterococcus faecalis* species are significant issue in severe nosocomial infections. In this study we aimed to investigate the effect of ionic liquids based on amino acids on pathogenic genes of this bacterium using Real time PCR.

Material and Methods: In this study, 100 samples of oral infections were taken from patients and Enterococcus faecalis strains were identified using biochemical tests. The presence and frequency of cyl, hyl and esp genes and their expression under the influence of ionic fluid were evaluated using real time-PCR.

Results: From the total samples taken, twelve *Enterococcus faecalis* bacteria were isolated and identified. The highest frequency of pathogenic genes was related to cyl gene which was present in 11 strains and the expression of target genes in the treated group under the influence of ionic fluid decreased compared to the control group ($p < 0.05$). With decreasing ion-based amino acid concentration, the ability of bacteria to form biofilms increased ($p < 0.05$).

Conclusion: Widespread antibiotic resistance is the most important concern about Enterococcus and cytolysin is a gelatinase enzyme and one of the most important invasive agents of Enterococcus faecalis. The results of this study provide a basis for promoting the use of new antibacterial agents, including ionic fluid, to prevent further pathogenicity of *Enterococcus faecalis*.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, ionic fluid, *cyl* gene, Real time PCR , Iau Science.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.7.6]

Corresponding author:
Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
Email: Dr_kumarss_amini@yahoo.com

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۲ - شماره۴۸ - پاییز۱۴۰۱
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

بررسی تأثیر مایعات یونی بر پایه اسید آمینه بر بیان ژن‌های بیماری‌زای سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از دهان

پریسا بنیادی [۱]، بهروز شجاعی سعدی[۱]، کیومرث امینی[۲*]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *انتروکوکوس فکالیس* عامل برخی عفونت‌های بیمارستانی است. هدف از انجام این تحقیق بررسی ژن‌های بیماری‌زای این باکتری در نمونه‌های بیماران و تأثیر مایعات یونی بر پایه اسید آمینه بر بیان آن‌ها با روش Real time PCR بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۱۰۰ نمونه از عفونت‌های دهانی بیماران گرفته شد و با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* در آن مورد شناسایی قرار گرفت. حضور و فراوانی ژن‌های *cyl*، *hyl* و*esp* و بیان آن‌ها تحت تأثیر مایع یونی، با استفاده از روش Real time-PCR ارزیابی گردید.

یافته‌ها: از مجموع کل نمونه‌های اخذ شده ۱۲ باکتری *انتروکوکوس فکالیس* جدا سازی گردیده و شناسایی شد. بیش‌ترین فراوانی حضور ژن‌های بیماری‌زا مربوط به ژن *cyl* بود که در ۱۱ سویه حضور داشت و بیان ژن‌های هدف در گروه تیمار شده تحت تأثیر مایع یونی نسبت‌به گروه کنترل کاهش یافت ($p< ۰/۰۵$). با کاهش غلظت اسید آمینه بر پایه یون، توانایی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها افزایش یافت ($p< ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: مقاومت‌های گسترده آنتی‌بیوتیکی مهم‌ترین عامل نگران کننده در مورد *انتروکوکوس* محسوب شده و سیتولایزین یک آنزیم ژلاتیناز و از جمله عوامل تهاجمی مهم باکتری *انتروکوکوس فکالیس* به‌شمار می‌رود. نتایج این تحقیق زمینه‌ای برای ترویج استفاده از مواد ضد باکتریایی جدید از جمله مایع یونی را به‌منظور جلوگیری از بیماری‌زایی بیش‌تر باکتری *انتروکوکوس فکالیس* فراهم می‌آورد.

واژگان کلیدی: *انتروکوکوس فکالیس*، مایع یونی، ژن *cyl*، Real time PCR، Iau Science.

مقدمه

انتروکوک‌ها باکتری‌های گرم مثبت بی‌هوازی اختیاری هستند که فلور نرمال دستگاه گوارش انسان هستند و به‌تازگی به‌عنوان پاتوژن‌های فرصت‌طلب در سراسر جهان به‌ویژه در عفونت‌های بیمارستانی شناخته شده‌اند. موفقیت این باکتری در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی به فاکتورهای بیماری‌زایی آن بستگی دارد که در کلونیزاسیون میکروارگانیسم، مقاومت‌به سیستم ایمنی، ایجاد رقابت با سایر میکروارگانیسم‌ها و نیز ایجاد آسیب به‌واسطه تولید فاکتورهای ترشحی و غیره دخالت دارند (۱). انتروکوک‌ها به‌خصوص در شرایطی مثل تخریب پوست، سرکوب و یا نقص سیستم ایمنی، بستری شدن طولانی مدت در بیمارستان و حتی استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها عفونت‌های خطرناکی هم‌چون باکتریمی، سپتی سمی، عفونت ادراری، مننژیت، عفونت زخم و ایجاد می‌کنند (۲).

نویسنده مسئول:
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران
پست الکترونیکی: Dr_kumarss_amini@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۸

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.7.6]

عوامل بیماری‌زایی هم‌چون ژن‌های همولیزین-سایتولیزین که در حدود ۳۱ درصد از گونه‌های *انتروکوکوس فکالیس* *(Enterococcus Faecalis)* دیده می‌شوند، در قسمت‌های جزایر پاتوژتیسته کدگذاری شده و سبب لیز گلبول‌های قرمز و سفید می‌گردند. چندین فاکتور ویرولانس در *انتروکوکوس فکالیس* توصیف شده که شامل ترکیب‌های پروتئین سطحی انتروکوک (*esp*)، سیتولیزین (*cyl*)، هیالورونیداز (*hyl*) و سایر پروتئین‌های دارای فعالیت همولیتیک بوده‌اند (۳). حدس زده می‌شود که این فاکتورها به‌صورت هم‌افزایی ویرولانس باکتری را افزایش می‌دهند که این امر منجر به صدمات بافتی و تهاجم عمقی‌تر باکتری و تشکیل بیوفیلم این باکتری می‌گردد (۴). پروتئین سطحی انتروکوکوس که توسط ژن *esp* رمزدهی می‌شود موجب افزایش بیماری‌زایی، کلونیزاسیون، پایداری در مجاری ادراری و تشکیل بیوفیلم می‌شود (۵). عفونت‌های انتروکوکی به‌صورت بالقوه می‌تواند دو خطر را به‌همراه خود داشته باشند، اول عفونت در اندوکارد یا مننژ اتفاق بیافتد و مسئله دوم مقاومت‌های گسترده آنتی‌بیوتیکی این باکتری است که سبب شکست در درمان آنتی‌بیوتیکی این عفونت‌ها می‌شود (۶). مقاومت روز افزون باکتری‌های مختلف به آنتی-بیوتیک‌های موجود از معضلات اصلی علم پزشکی محسوب می‌گردد که پیش‌بینی شده است در دهه‌های آینده به مهم-ترین معضل بشری تبدیل گردد. از سوی دیگر عوارض نامحدود ترکیب‌های آنتی‌بیوتیکی می‌تواند منجر به بروز بیماری‌های حتی خطرناک‌تر از عفونت باکتریایی را فراهم آورد (۷). لذا امروزه تحقیقات در مورد مواد آنتی باکتریال جدید و نیز روش‌های نوین شکست مقاومت‌های میکروبی از مهم‌ترین زمینه‌های مطالعه‌های دانشمندان محسوب می-شود. مایعات یونی (IL) نمک‌هایی با نقاط ذوب زیر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد هستند (بعضی از آن‌ها در دمای اتاق مایع هستند) که از جفت شدن کاتیون‌های آلی با آنیون‌های آلی و معدنی حاصل می‌شوند و اثرات ضد میکروبی آن‌ها نیز در مطالعه‌های مختلف مشاهده شده است (۸).

در بررسی پیشینه تحقیق مشخص گردید مایعات یونی در دهه گذشته به یک گروه حلال محبوب تبدیل شده‌اند و کاربردهای بالقوه این مواد متنوع‌تر شده است. تحقیقات در مورد مایعات یونی به‌جای اینکه صرفاً به‌عنوان جایگزینی برای محیط‌های حلال آلی معمولی در نظر گرفته شود، به-دلایل افزایش سرعت، ویژگی و عملکرد به سمت انتخاب و طراحی عمدی این مواد پیش رفته است. طراحی مایعات یونی بر توسعه کاتیون‌ها و آنیون‌های جدید متمرکز است تا ویژگی‌های فیزیکی خاص مورد نیاز برای هر کاربرد را ایجاد کند. بنابراین، مواد در حال سنتز و مطالعه نیز به‌طور فزاینده‌ای پیچیده و متنوع می‌شوند. مطالعه Pendelton و همکاران بر روی اثر گذاری این مایعات بر تولید بیوفیلم نشان داد که آن‌ها اثرات قابل توجه ضد میکروبی را از خود نشان می‌دهند (۹). اثرات ضد میکروبی مایعات یونی بر پایه پیریدینیوم و ایمیدازولیوم نیز در مطالعه Cornellas دیده شد (۱۰).

این مطالعه بر آن بوده است تا با بررسی ژن‌های بیماری‌زای سویه‌های جداسازی شده *انتروکوکوس فکالیس* از دهان و دندان بیماران، تأثیر مایعات یونی بر پایه اسید آمینه بر بیان آن‌ها با روش Real time PCR بررسی نماید.

مواد و روش‌ها

جداسازی سویه‌ها

برای انجام این تحقیق به‌طور کلی و با توجه‌به فرمول نمونه-گیری جسی-مورگان، ۱۰۰ نمونه از افراد مبتلا به عفونت-های دهان مراجعه کننده به مراکز دندان پزشکی سطح شهر تهران اخذ شده و در محیط کشت اختصاصی کشت داده شده است. تمامی نمونه‌ها جهت جداسازی باکتری انتروکوکوس و سویه *انتروکوکوس فکالیس* با تست‌های استاندارد (۱۲،۱۱) شامل رنگ‌آمیزی گرم، مورفولوژی کلنی و تست‌های بیوشیمیایی هم‌چون حساسیت‌به باسیتراسین، حساسیت‌به تری متوپریم سولفامتاکسازول (SXT)، تست همولیزین بر روی بلاد آگار، رشد بر روی محیط نمک ۶/۵ درصد، تست هیدرولیز ال- پیرولیدونیل - بتا- نفتیل آمید (PYR)، رشد در دمای ۶۲°C، رشد بر روی محیط بایل اسکولین مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تأیید جداسازی *انتروکوکوس فکالیس* از آزمون‌های بیوشیمیایی تخمیر قندهای لاکتوز، سوربیتول، مانیتول، آرابینوز، سوربوز، استفاده گردید. از سویه *انتروکوکوس فکالیس* ATCC29212 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

بررسی مولکولی

به‌منظور بررسی ژنومی، کلنی سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* رشد کرده در محیط اختصاصی مورد استخراج DNA توسط کیت اختصاصی (سیناژن، ایران) قرار گرفتند. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده توسط الکتروفورز در

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.7.6]

ژل آگاروز ۲ درصد و اسپکتروفتومتری در نانودراپ (اپندورف، آلمان) تأیید می‌گردید. پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner طراحی گردیدند. پس از استخراج DNA از انتروکوکوس‌های ایزوله شده، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه (Multiplex PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جدول ۱ و با مراحل ذیل انجام گردید. آزمون با مقادیر مواد ۱۰ میکرولیتر PCR Master Mix (Amplicon) 2x، ۰/۸ میکرولیتر از هر کدام یک از پرایمرها با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر و ۴ میکرولیتر از DNA الگو (۱۵۰ نانوگرم) برای هر واکنش در مراحل دمایی، دناتوراسیون اولیه در دمای $95^{\circ}C$ به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون $95^{\circ}C$ ۹۵ به‌مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای $55^{\circ}C$ ۵۵ به‌مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای $72^{\circ}C$ به‌مدت ۱ دقیقه، و پس از ۳۵ چرخه مرحله تکثیر نهایی در دمای $72^{\circ}C$ به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام پذیرفت. در نهایت محصولات PCR در ژل توسط رنگ‌آمیزی با غلظت‌های پایین محلول رنگ اریتروژل و مشاهده مستقیم آن تحت تأثیر تابش نور ماورای بنفش تشخیص داده شده و عکس‌برداری شدند.

جدول ۱. مشخصات پرایمر های مورد استفاده در این مطالعه

ژن	عوامل حدت	توالی پرایمر در جهت ´۵ به ´۳	اندازه (جفت باز)
cylA	*cytolysin*	F: ACTCGGGGATTGATAGGC R: GCTGCTAAAGCTGCGCTT	۸۶۶
esp	*Enterococcal surface protein*	F:AGATTTCATCTTTGATTCTTGG R: AATTGATTCTTTAGCATCTGG	۲۴۲
hyl	*hyaluronidase*	F:ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG R:GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	۶۷۸

پس از تعیین سویه‌های دارای بیش‌ترین تعداد فاکتورهای ویرولانس هدف این مطالعه، بررسی اثر مایع یونی بر بیان ژن‌های ویرولانس در آن‌ها صورت گرفت.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی مایع یونی

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) مایع یونی بر پایه اسید آمینه به روش میکروبراث دایلوشن صورت گرفت. جهت انجام آزمایش MIC ابتدا غلظت ۴۰۴۸ میکروگرم در میلی‌لیتر از محلول استاندارد مایعات یونی (مرک، آلمان) در محلول DMSO آماده گردید.

سپس از محیط کشت مولر هینتون براث محتوی معادل نیم مک فارلند از باکتری مورد مطالعه، ۱۰۰ میکرولیتر داخل ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته شد. سپس به اولین چاهک هر ردیف ۱۰۰ میکرولیتر عصاره غلظت ۴۰۴۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید و رقت سریالی تا چاهک دهم ادامه میافت و در نهایت پلیت در دمای ۳۷ درجه برای مدت ۲۴ ساعت انکوبه می‌گردید. وجود یا عدم وجود کدورت نشان-دهنده رشد یا عدم رشد باکتری بود. غلظت موجود در یک چاهک قبل از چاهک دارای تغییر جهشی کدورت، به‌عنوان MIC تعیین می‌گردید.

تعیین میزان بیان ژن‌های هدف در حضور مایع یونی

قبل از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مقادیر ۱۰ میکرولیتر از غلظت subMIC مایع یونی در حجم ۲۰ میلی‌لیتر از BHI براث ریخته و معادل نیم مک فارلند به آن باکتری انتروکوکوس فکالیس دارای ژن‌های هدف اضافه شد. پس از ۱۵ ساعت نگهداری (Late lag phase) که بهترین مرحله برای استخراج RNA است، استخراج RNA توسط کیت اختصاصی(QIAamp RNA Mini Kit, Germany) با توجه‌به دستورالعمل آن انجام شد. با تأیید کیفیت RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ، سنتز cDNA با استفاده از آنزیم Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase (AMV) با غلظت ۲۵ µl/unit توسط کیت اختصاصی آن (Roche, Germany) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت اختصاصی (ترموفیشر، آمریکا) به‌صورت زیر انجام شد: ۱۰ میکرولیتر از Prime Qmaster mix (2x) دارای سایبرگرین، ۵ میکرولیتر از diethylpyrocarbonate water (DEPC)، یک میکرولیتر از پرایمر فوروارد، یک میکرولیتر از پرایمر ریورس، یک میکرولیتر از Rox dye و ۲ میکرولیتر از CDNA استفاده شد. تکثیر قطعه‌های مورد نظر در دستگاه Corbet (Corbet, Australia) با برنامه دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، تکثیر شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن خانگی *16srRNA* به‌عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.7.6]

سنجش تولید بیوفیلم در انتروکوکوس فکالیس و تاثیر مایع یونی بر آن

به‌منظور سنجش بیوفیلم از *انتروکوکوس فکالیس* رشد یافته محیط Trypticase soy broth (TSB)استفاده شد. ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی برابر با نیم مک فارلند به گودهای میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه و در دمای ۳۷°C به‌مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. میکروپلیت سه مرحله توسط آب مقطر استریل شسته و بعد به‌مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت تا خشک شود. بیوفیلم اتصال یافته با افزودن سافرانین ۰/۱ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه رنگ‌آمیزی شد. سپس سه مرحله با آب مقطر استریل شسته شد تا رنگ اضافی حذف و بعد از خشک شدن در دمای آزمایشگاه، جذب نوری بیوفیلم بر روی سطح ته گوده پلیت خشک شده در۴۹۰ OD با Reader ELISA قرائت گردید. سپس میانگین و انحراف معیار محاسبه شد. از سویه *انتروکوکوس فکالیس* ۲۹۲۱۲ ATCC به عنوان شاهد استفاده گردید. باکتری‌های مورد استفاده در محیط کشت TSB به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس انکوبه شدند، سپس با استفاده از رقت‌سازی سریالی، استوک باکتری با غلظت 10^6 cfu/mlتهیه شد. هر میکروپلیت برای دو باکتری مورد استفاده قرار گرفت و برای هر باکتری اسید آمینه بر پایه یونی با غلظت MIC- ۴ تهیه شد. در هر ردیف، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت TSB درون چاهک‌ها ریخته شد، سپس در چاهک اول، ۱۰۰ میکرولیتر از استوک نانو ذره با غلظت MIC - ۴ ریخته شد و رقت‌سازی سری دوتایی انجام گرفت که در پایان غلظت اسید آمینه بر پایه یونی در چاهک‌ها به‌ترتیب برابر MIC ۲، MIC، MIC ۱/۲، MIC ۱/۴ و MIC ۱/۸ شد. این مراحل برای هر باکتری در ۳ ردیف (۳ تکرار) انجام شد. یک ردیف از میکروپلیت به‌عنوان کنترل نانوذره در نظر گرفته شد که تنها محیط کشت و غلظت‌های مختلف نانوذره در چاهک‌ها ریخته شد. میکروپلیت به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس انکوبه شد. پس از طی این مدت، محیط کشت موجود در هر چاهک خالی شد، سپس چاهک‌ها ۳ بار با بافر فسفات استریل (PBS) شسته شدند. پس از آن میکروپلیت‌ها به‌صورت وارونه به‌مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند تا خشک شدند. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول کریستال ویوله ۰/۲ درصد به هر چاهک افزوده شد و میکروپلیت ۱۵ دقیقه بدون حرکت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس قرار گرفت. پس از آن رنگ داخل چاهک‌ها خارج شد و دوباره شستشو با بافر فسفات استریل انجام گرفت و میکروپلیت‌ها در دمای اتاق خشک شدند.۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۳۰ ٪اسید استیک به هر چاهک افزوده شد تا رنگ باندشده با باکتری‌های تشکیل دهندهٔ بیوفیلم استخراج شود. سپس جذب نوری این محلول در طول موج ۵۹۵ نانومتر با میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری شد (۱۳).

نتایج

نتایج جداسازی سویه‌ها

در این مطالعه ۶۰ ایزوله *انتروکوکوس فکالیس* از بیماران ۱۴ تا ۶۰ ساله با میانگین سنی ۲۸ سال جداسازی شدند. بیش‌ترین تعداد باکتری جدا شده مربوط به گروه سنی ۵۹-۳۰ سال بود. ۴۳ ایزوله (۷۱/۶۷ ٪) *انتروکوکوس فکالیس* از مردان جداسازی شد. معیار تأیید جدایه‌های انتروکوکوس، ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی این باکتری بود. پس از تشخیص، نمونه‌هایی که خصوصیت‌های بیوشیمیایی آن‌ها شامل کوکسی‌های گرم مثبت کاتالاز منفی، تخم‌مرغی شکل و غیر هاگ‌زا که به‌صورت جداگانه در دمای ۱۰ تا ۴۵ درجه شد می‌نمودند به‌عنوان نمونه مثبت درج گردیدند و کلنی‌های مربوط ذخیره شدند.

نتایج آزمایش Multiplex PCR جهت شناسایی ژن-های بیماری‌زا

شکل شماره ۱ نتایج واکنش MultiplexPCR را در ۱۲ ایزوله *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از عفونت‌های دهانی را نشان می‌دهد. در این تصاویر می‌توان باندهای مربوط به ژن-های مختلف را در سویه‌های جدا شده مشاهده کرد. از نمونه‌های آزمایشگاهی برای شناسایی ژن‌های کدکننده cyl، esp، hyl با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و هم‌چنین سویه *انتروکوکوس فکالیس* تولید کننده ژن‌های مورد نظر به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. داده‌ها نشان داد که در ۲ ایزوله ژن esp (۱۶/۶ درصد)، در۱۱ ایزوله ژن cyl و در ۱۰ سویه، ژن hyl (۸۳/۳ درصد) ملاحظه گردید که بیش‌ترین فراوانی (۹۱/۶ درصد) مربوط به ژن cyl بود.

تعیین غلظت MIC و Sub MIC مایع یونی

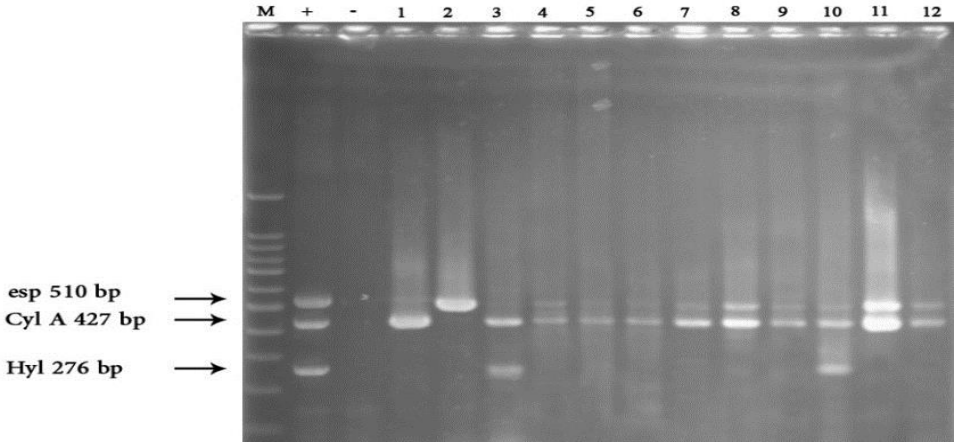
داده‌ها نشان داد که غلظت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از مایع یونی قابلیت باکتریسیدال را دارد. هم‌چنین غلظت ۲۲۵ µg/ml به‌عنوان غلظت subMIC تعیین گردید.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

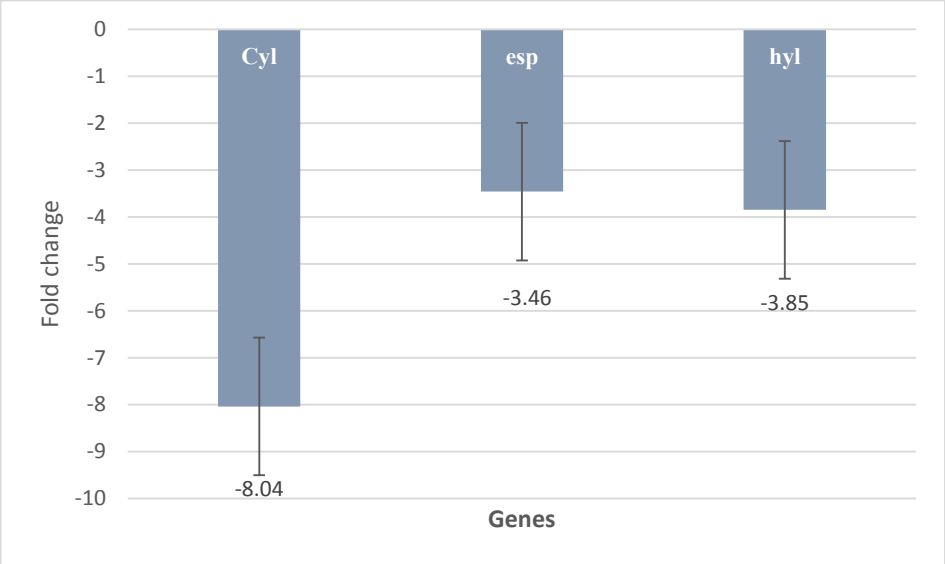
[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.7.6]

نتایج بررسی بیان ژن

بیان ژن‌های هدف و ژن خانه دار 16srRNA پس از تیمار سویه‌ها انتروکوکوس فکالیس با غلظت subMIC بررسی گردید. بررسی منحنی ذوب واکنش‌های Real time RT-PCR نشان داد که این نمودارها به‌صورت تک باند و اختصاصی بوده اند. نتایج آزمون T-test نشان داد که بیان ژن‌های هدف در هر ۳ ژن کاهش یافته بود اما این کاهش در ژن Cyl به‌صورت بسیار معنی‌دار (p<۰/۰۵، CI=95%) رخ داده بود و در ژن‌های hyl و ESP پس از تیمار با مایع یونی میزان کاهش در سطح کم-تری رخ داده بود (p<۰/۰۵).



شکل ۱. نتیجه الکتروفورز محصولات MultiplexPCR در ژل آگاروز ۲٪ .نمونه ۱ تا ۱۲، به‌ترتیب از چپ به راست: DNA Ladder، +: کنترل مثبت، -: کنترل منفی.



شکل ۳. نمودار تغییرهای Fold change ژن‌های هدف در سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس*

نتایج تست تشکیل بیوفیلم

بر اساس نتایج جدول ۲، ۳۹ ایزوله (۶۵ ٪) از ۶۰ ایزوله توانایی تولید بیوفیلم را بصورت متوسط و شدید داشته اند و بیشترین میزان تولید بیوفیلم در گروه سنی ۵۹-۳۰ مشاهده شد. درصد تشکیل بیوفیلم توسط سویه های مورد مطالعه در حضور غلظتهای مختلف مایع یونی در نمودار ۱ نشان داده شده است. همانطور که در نمودار مشاهده می شود، با کاهش غلظت اسید آمینه بر پایه یون، توانایی تشکیل

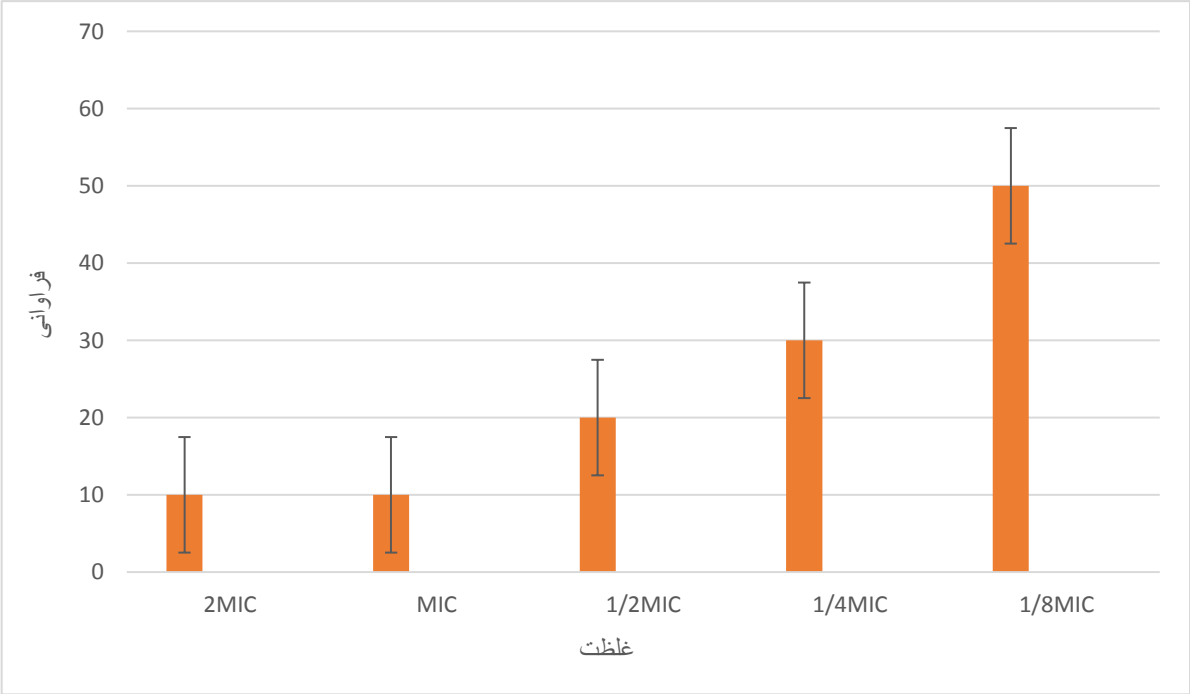
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.7.6]

بیوفیلم توسط باکتریها افزایش یافت. به عبارت دیگر اسید آمینه بر پایه یون می تواند در غلظت sub-MIC یا همان 1/2MIC نیز تولید بیوفیلم را کاهش دهد (P<۰/۰۵).

جدول ۲: بررسی رابطه بین تشکیل بیوفیلم و متغیرهای دموگرافیک در جمعیت مطالعه

خصوصیات دموگرافیک		تشکیل بیوفیلم (OD:490 nm)		P-value
		بیوفیلم شدید و متوسط تعداد (٪)	بیوفیلم ضعیف تعداد (٪)	
جنس	زن	۱۱ (۱۸,۳۴)	۶ (۱۰)	P < 0.05
	مرد	۲۸ (۴۶,۶۶)	۱۵ (۲۵)	
سن (سال) ۱۱-۴ سال		۵(۱۲,۸۲)	۳(۱۴,۲۸)	P < 0.05
۱۷-۱۲ سال		۲(۵,۱۲)	۱(۴,۷۶)	
۲۹-۱۸ سال		۴(۱۰,۲۵)	۳(۱۴,۲۸)	
۵۹-۳۰ سال		۱۷(۴۳,۵۸)	۷(۳۳,۳۴)	
۶۰ < سال		۱۱(۲۸,۲۳)	۷(۳۳,۳۴)	
کل		۳۹ (۱۰۰)	۲۱(۱۰۰)	



شکل ۱. درصد سویه‌های مولد بیوفیلم در غلظت‌های مختلف مایع یونی

بحث

مطالعه هر چه بیش‌تر مکانیسم بیماری‌زایی و پاتوژنز باکتری *انتروکوکوس فکالیس* که اغلب به‌عنوان فلور نرمال در انسان مطرح است، می‌تواند راهکارهای جدید و مناسبی را جهت پیشگیری و درمان عفونت‌های شایع بیمارستانی حاصله از این ارگانیسم‌ها، حاصل آورد. مقاومت‌های گسترده آنتی‌بیوتیکی مهم‌ترین عامل نگران کننده در مورد *انتروکوکوس* محسوب می‌گردد و لذا شناخت عوامل مؤثر در این امر و بررسی اثر درمانی داروهای جدید جایگزین می‌تواند در راستای کاهش بار عفونت‌های ناشی از *انتروکوکوس* کمک کننده باشد(۷،۱۴). یکی از مهم‌ترین این عوامل، ژن‌های حدت هستند که به‌ضرورتدر این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. Salehi و همکاران در سال

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.7.6]

۱۳۹۱، در مطالعه تجربی تعداد ۲۱۴ نمونه کلینیکی شامل ۸۰ نمونه کانتر اداری و ۱۳۴ نمونه ادرار از بیماران جمع-آوری شد. نتایج آن‌ها نشان داد که ژن *esp* در ۸۳ درصد از نمونه‌های ادرار و ۹۷ درصد کانترهای اداری و ژن *esp* در ۱۰۰ نمونه‌های ادرار و ۹۰ درصد از کانترهای اداری حضور داشتند. میزان مقاومت چند دارویی سویه‌های انتروکوکی نسبت‌به جنتامایسین و تتراسایکلین ۷۸/۱ درصد، سفالوسپورین ۷۵ درصد، جنتامایسین و سفالوسپورین ۵۹/۳ درصد و جنتامایسین و استرپتومایسین ۵۳ درصد برآورده شد (۱۵). این نتایج می‌تواند به‌عنوان ابزار تشخیصی سریع به‌منظور ارزیابی تولید فرومون و فراهم نمودن شرایط لازم جهت انتقال پلاسمیدها بین سویه‌های کلینیکی و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشد. در تحقیق حاضر به بررسی اثرات ضد میکروبی مایعات یونی بر روی ژن‌های *cyl*، *esp*، *hyl* پرداخته شد که نتایج به‌دست آمده از نظر فراوانی سویه‌ها با تحقیق حاضر در یک راستا بود. کمری و همکاران در سال ۱۳۹۵، ۲۰۰ گونه *انتروکوکوس* جدا شده از گوشت را جهت بررسی شیوع ژن‌های *esp*، *cyla* PCR مطالعه نمودند. هم‌چنین این سویه‌ها نظر تشکیل بیوفیلم با استفاده روش off-cut مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. *انتروکوکوس* جدا شده از گوشت در این پژوهش دارای شیوع بالایی از ژن *esp* بودند. اثبات شده است که این ژن در تشکیل بیوفیلم نقش دارد. هم‌چنین این پژوهش نیز ثابت کرد که ۶۸٪ از باکتری‌های که بیوفیلم قوی تشکیل دادند دارای ژن *esp* بودند. توانایی تشکیل بیوفیلم می‌تواند مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها را افزایش دهد و خطر آلودگی گوشت‌های مصرفی در ایجاد عفونت‌های مقاوم افزایش می‌یابد. شیوع ژن سیتولیزین گرچه کم‌تر از *esp* بود اما همین شیوع کم نیز می تواند سبب افزایش عفونت باکتری شود و با تحقیق حاضر مطابقت دارد. در مطالعه حاضر نیز بروز بیوفیلم قوی در سویه‌های دارای ژن esp صورت می‌گرفت. کاظمینی و همکاران در سال ۱۳۹۴، در مطالعه‌ای تعداد ۲۰۰ نمونه مدفوع از مراکز درمانی کرمان جمع‌آوری کردند و با کشت در محیط اختصاصی از جمله KF استرپتوکوک آگار و انجام آزمون‌های بیوشیمیایی، تعداد ۶۰ نمونه انتروکوک فکالیس شناسایی گردید. نتایج نشان داد که میزان آلودگی به باکتری *انتروکوک فکالیس* در زنان ۵۲ درصد و در مردان ۴۸ درصد است. هم‌چنین شیوع ژن-های حدت در زنان بیش‌تر از مردان بود که در راستای داده-

کم‌ترین فراوانی را در ژن *clya* (۱۶/۱٪) شناسایی شد، *Hyl* در هیچ‌یک از نمونه-ها ردیابی نگردید. بر خلاف این پژوهش، در تحقیق حاضر بیش‌ترین فراوانی مربوط به ژن *cyl* بود. Niyazi و همکاران، مجموعه‌ای از نمک‌های برمید ایمیدازولیوم (NIM-Br 1a، b۱ و c۱) با طول‌های مختلف زنجیره‌های آلکیل سنتز شدند و فعالیت‌های ضد باکتریایی آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی با اندازه‌گیری حداقل غلظت مهاری (MIC) برای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروکوکوس فکالیس* تعیین شد (۱۶). علاوه‌بر این، این مشتقات ایمیدازولیوم نیز در برابر بیوفیلم تولید شده توسط این سویه‌های باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. همه ترکیب‌ها در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مؤثر بودند و هم‌چنین در تولید بیوفیلم *S. aureus* از سایر مؤثرتر بودند. در پژوهش حاضر مایعات یونی موجب کاهش بیان ژن‌های ویرولانس شد. Izabelle Mو همکاران، فعالیت ضد میکروبی در مقابل گونه‌های باکتریایی از نظر اهمیت بالینی در بهبود زخم‌ها و محیط دهان مورد آزمایش قرار گرفت، نتایج نشان داد که مایعات یونی در مهار رشد باکتری‌ها حتی در حداقل غلظت مهاری (MIC) اثر مهمی دارد. هم‌چنین نتایج نشان داد که مایعات یونی مبتنی‌بر ایمیدازولیوم سنتز شده ممکن است یک استراتژی قوی برای برنامه‌های کاربردی با استفاده از مواد غیر سمی دارای فعالیت ضد میکروبی باشد (۱۷) که با تحقیق حاضر هم‌راستا بود.

Alizadeh Sarvandani و همکاران نشان دادند که از ۶۰ ایزوله مورد بررسی ۱۲ باکتری انتروکوک فکالیس واجد ژن *esp* بودند. نتایج MIC و سنجش بیان ژن نشان دادند که عصاره نانوکورکومین اثر ضدمیکروبی و مهاری بر روی تشکیل بیوفیلم و بیان ژن *esp* در ایزوله‌های باکتری انتروکوک فکالیس ندارد (۱۸). Trendolkar و همکاران بیان نمودند که پروتئین سطحی انتروکوک، به‌عنوان یک فاکتور کلیدی برای توانایی انتروکوکوس فکالیس در تشکیل بیوفیلم، در یک وضعیت وابسته‌به گلوکز است. در مطالعه Seno و همکاران ظرفیت تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های دارای پروتئین سطحی به‌طور قابل توجهی بیش‌تر از ایزوله-های فاقد پروتئین سطحی بود. در صورتی‌که Trendolkar و همکاران چنین اثر همگرایی را بین ژلاتیناز و پروتئین سطحی انتروکوک بر روی تشکیل بیوفیلم نشان ندادند. هم-

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.7.6]

تشکیل بیوفیلم ضروری نبوده ولی وجود آن با تشکیل مقادیر بالایی از بیوفیلم همراه بوده است (۱۹). Taghavi Zenouzو همکاران در سال ۲۰۱۶ در یک مطالعه آزمایشگاهی، اثرات فتودینامیک تراپی در حضور متیلن بلو و هایپرسین بر دو میکروارگانیسم *انتروکوکوس فکالیس* و *سودوموناس ائروژینوزا* را بررسی کرده و به این نتیجه رسیدند که کاربرد هایپرسین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با و بدون لیزر تراپی خاصیت باکتریوسیدال علیه دو باکتری *انتروکوکوس فکالیس و سودوموناس ائروژینوزا* دارد و با کاهش غلظت هایپرسین به مقادیر کم‌تر از ۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر خاصیت آنتی باکتریال آن کاهش یافته، میکروارگانیسم‌ها در محیط کشت رشد نمودند (۲۰).

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌های *انتروکوکوس فکالیس* از نظر ژنتیکی متنوع هستند و این موضوع نشان دهنده شیوع پلی کلونال سویه‌ها در نمونه‌های بالینی است. پروتئین‌های ادهسین می‌توانند نقش مهمی در ایجاد و انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی داشته باشند. تأثیر مثبت این مطالعه بر روی کاهش بیان ژن‌های بیماری‌زا نشان داد که درمان ترکیبی مایع یونی با داروهای ضد میکروبی رایج، اثرات ضد باکتری خوبی را علیه گونه‌های *انتروکوکوس* نشان می‌دهند و مایع یونی با حداقل دوز مصرفی می‌تواند جایگزین مناسبی برای درمان تک دارویی عفونت‌های انتروکوکی، همراه با جلوگیری از بروز اثرات نامناسب در مراحل درمان، صرفه‌جویی در مصرف دارو و کاهش هزینه ها باشد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.7.6]

منابع

1. García-Solache M, Rice LB. The Enterococcus: a model of adaptability to its environment. Clinical microbiology reviews. 2019;32(2):e00058-18.

2. Hanchi H, Mottawea W, Sebei K, Hammami R. The genus Enterococcus: between probiotic potential and safety concerns—an update. Frontiers in microbiology. 2018;9:1791.

3. McBride SM, Fischetti VA, LeBlanc DJ, Moellering Jr RC, Gilmore MS. Genetic diversity among Enterococcus faecalis. PloS one. 2007;2(7):e582.

4. Pöntinen AK, Top J, Arredondo-Alonso S, Tonkin-Hill G, Freitas AR, Novais C, et al. Apparent nosocomial adaptation of Enterococcus faecalis predates the modern hospital era. Nature communications. 2021;12(1):1-13.

5. Keogh D, Lam LN, Doyle LE, Matysik A, Pavagadhi S, Umashankar S, et al. Extracellular electron transfer powers Enterococcus faecalis biofilm metabolism. MBio. 2018;9(2):e00626-17.

6. Rodrigues CT, De Andrade F, De Vasconcelos L, Midena R, Pereira T, Kuga M, et al. Antibacterial properties of silver nanoparticles as a root canal irrigant against Enterococcus faecalis biofilm and infected dentinal tubules. International Endodontic Journal. 2018;51(8):901-11.

7. Yelin I, Kishony R. Antibiotic resistance. Cell. 2018;172(5):1136-. e1.

8. Ferraz R, Silva D, Dias AR, Dias V, Santos MM, Pinheiro L ,et al. Synthesis and antibacterial activity of ionic liquids and organic salts based on penicillin g and amoxicillin hydrolysate derivatives against resistant bacteria. Pharmaceutics. 2020;12(3):221.

9. Pendleton JN, Gilmore BF. The antimicrobial potential of ionic liquids: A source of chemical diversity for infection and biofilm control. International journal of antimicrobial agents. 2015;46(2):131-9.

10. Cornellas A, Perez L, Comelles F, Ribosa I, Manresa A, Garcia MT. Self-aggregation and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium based ionic liquids in aqueous solution. Journal of colloid and interface science. 2011;355(1):164-71.

11. Zoletti G, Siqueira Jr J, Santos K. Identification of Enterococcus faecalis in Root-filled Teeth With or Without Periradicular Lesions by Culture-dependent and—Independent Approaches. Journal of endodontics. 2006;32(8):722-6.

12. Santos R, Sau N, Certucha M, Almendáriz F, Monge A, Zepeda I, et al. Rapid detection of bacteria, Enterococcus faecalis, in airborne particles of Hermosillo, Sonora, México. Journal of Environmental Biology. 2019;40(4):619-25.

13. Partoazar A, Talaei N, Bahador A, Pourhajibagher M, Dehpour S, Sadati M, et al. Antibiofilm activity of natural zeolite supported NanoZnO: inhibition of Esp gene expression of Enterococcus faecalis. Nanomedicine. 2019;14(6):675-87.

14. Pazda M, Kumirska J, Stepnowski P, Mulkiewicz E. Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems–a review. Science of the Total Environment. 2019;6.۹۷:۱۳۴۰۲۳

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.7.6]

15. Salehi M, Mosavari N, Hosseini F, Mobaraki M. The evaluation of esp and eep genes in Enterococcus strains isolated from clinical urine samples in Tehran. evaluation. 2012;15(62):39-48.

16. Duman AN, Ozturk I, Tunçel A, Ocakoglu K, Colak SG ,Hoşgör-Limoncu M, et al. Synthesis of new water-soluble ionic liquids and their antibacterial profile against gram-positive and gram-negative bacteria. Heliyon. 2019;5(10):e02607.

17. Rodriguez LC, Palmer KL, Rodrigues DC. Dicationic Imidazolium-Based Ionic Liquids: A New Strategy for Non-Toxic and Antimicrobial Materials. 2014.

18. Alizadeh Sarvandani S, Amini K, Saffarian P. Evaluation of antimicrobial activity of Curcumin nanoparticles on the gene expression of the enterococcal surface protein, Esp, involved in biofilm formation of Enterococcus Faecalis. Razi Journal of Medical Sciences. 2019;26(9):39-46.

19. Ghasemi A, Moniri R, Khorshidi A, Musavi GA. The survey of virulence factors of Enterococcus faecalisisolated from urine samples. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2009;2(3):53-8.

20. Zenuz AT, Eslami H, Kafil HS, Safari E, Ghanizadeh M, Mohammadi A. The application of antimicrobial photodynamic therapy on Pseudomonas aeuroginosa and Enterococcus fecalis using hypericin and methylene blue photosensitizers. Biomedical and Pharmacology Journal. 2016;9(2):443-50.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.7.6]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.7.6] [Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]