



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 Bonyadi¹, Behrooz Shojaee saadi¹, 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.

Corresponding author:

Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Email: Dr_kumarss_amini@yahoo.com





برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

بررسی تأثیر مایعات یونی بر پایه اسید آمینه بر بیان ژن های بیماری زای سویه های *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 عفونت های بیمارستانی است. هدف از انجام این تحقیق بررسی ژن های بیماری زای این باکتری در نمونه های بیماران و تأثیر مایعات یونی بر پایه اسید آمینه بر بیان آن ها با روش Real time PCR بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه ۱۰۰ نمونه از عفونت های دهانی بیماران گرفته شد و با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی سویه های *انتروکوکوس فکالیس* در آن مورد شناسایی قرار گرفت. حضور و فراوانی ژن های *hly*، *esp* و بیان آن ها تحت تأثیر مایع یونی، با استفاده از روش Real time-PCR ارزیابی گردید.

یافته ها: از مجموع کل نمونه های اخذ شده ۱۲ باکتری *انتروکوکوس فکالیس* جدا سازی گردیده و شناسایی شد. بیشترین فراوانی حضور ژن های بیماری زا مربوط به ژن *cyl* بود که در ۱۱ سویه حضور داشت و بیان ژن های هدف در گروه تیمار شده تحت تأثیر مایع یونی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($p < 0/05$). با کاهش غلظت اسید آمینه بر پایه یون، توانایی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری ها افزایش یافت ($p < 0/05$).

نتیجه گیری: مقاومت های گسترده آنتی بیوتیکی مهم ترین عامل نگران کننده در مورد *انتروکوکوس* محسوب شده و سیتولایزین یک آنزیم ژلاتیناز و از جمله عوامل تهاجمی مهم باکتری *انتروکوکوس فکالیس* به شمار می رود. نتایج این تحقیق زمینه ای برای ترویج استفاده از مواد ضد باکتریایی جدید از جمله مایع یونی را به منظور جلوگیری از بیماری زایی بیش تر باکتری *انتروکوکوس فکالیس* فراهم می آورد.

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

مقدمه

این باکتری در ایجاد عفونت های بیمارستانی به فاکتورهای بیماری زایی آن بستگی دارد که در کلونیزاسیون میکروارگانیسم، مقاومت به سیستم ایمنی، ایجاد رقابت با سایر میکروارگانیسم ها و نیز ایجاد آسیب به واسطه تولید فاکتورهای ترشچی و غیره دخالت دارند (۱). *انتروکوکوس* به خصوص در شرایطی مثل تخریب پوست، سرکوب و یا نقص سیستم ایمنی، بستری شدن طولانی مدت در بیمارستان و حتی استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک ها عفونت های خطرناکی هم چون باکتری می، سپتی سمی، عفونت ادراری، مننژیت، عفونت زخم و ایجاد می کنند (۲).

*انتروکوکوس*ها باکتری های گرم مثبت بی هوازی اختیاری هستند که فلور نرمال دستگاه گوارش انسان هستند و به تازگی به عنوان پاتوژن های فرصت طلب در سراسر جهان به ویژه در عفونت های بیمارستانی شناخته شده اند. موفقیت

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

عوامل بیماری‌زایی هم‌چون ژن‌های همولیزین-سایتولیزین که در حدود ۳۱ درصد از گونه‌های *انتروکوکوس فکالیس* (*Enterococcus Faecalis*) دیده می‌شوند، در قسمت‌های جزایر پاتوژتیسسته کدگذاری شده و سبب لیز گلوبول‌های قرمز و سفید می‌گردند. چندین فاکتور ویروانس 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 ویروانس 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 *انتروکوک* 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 آنتی‌بیوتیک‌های موجود از معضلات اصلی علم پزشکی محسوب می‌گردد که پیش‌بینی شده است در دهه‌های آینده به مهم‌ترین 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 آنتی‌باکتریال جدید و نیز روش‌های نوین شکست مقاومت‌های میکروبی از مهم‌ترین زمینه‌های مطالعه‌های دانشمندان محسوب می‌شود. 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، به‌دلایل 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 توجه به فرمول نمونه‌گیری جسی-مورگان، ۱۰۰ نمونه از افراد مبتلا به عفونت‌های 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 حساسیت به باسیتراسین، حساسیت به تری متوپریم سولفامتاکسازول (SXT)، تست همولیزین بر روی بلاد آگار، رشد بر روی محیط نمک ۶/۵ درصد، تست هیدرولیز آل-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

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 پلی‌مرز 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

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

ژن	عوامل حدت	توالی پرایمر در جهت ۵' به ۳'	اندازه (جفت باز)
<i>cylA</i>	<i>cytolysin</i>	F: ACTCGGGGATTGATAGGC R: GCTGCTAAAGCTGCGCTT	۸۶۶
<i>esp</i>	<i>Enterococcal surface protein</i>	F: AGATTTCATCTTTGATTCTTGG R: AATTGATCTTTAGCATCTGG	۲۴۲
<i>hyl</i>	<i>hyaluronidase</i>	F: ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG R: GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	۶۷۸

BHI برات 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 توجه به 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 پلی‌مرز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت اختصاصی (ترموفیشر، آمریکا) به صورت 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* به عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد.

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

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی مایع یونی

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) مایع یونی بر پایه اسید آمینه به روش میکروبراث دایلوژن 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 برات 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 می‌یافت و در نهایت پلیت در دمای ۳۷ درجه برای مدت ۲۴ ساعت انکوبه می‌گردید. وجود یا عدم وجود کدورت نشان‌دهنده رشد یا عدم رشد باکتری بود. غلظت موجود در یک چاهک قبل از چاهک دارای تغییر جهشی کدورت، به عنوان MIC تعیین می‌گردید.

تعیین میزان بیان ژن‌های هدف در حضور مایع یونی

قبل از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز مقادیر ۱۰ میکرولیتر از غلظت subMIC مایع یونی در حجم ۲۰ میلی‌لیتر از

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

به منظور سنجش بیوفیلیم از انتروکوکوس فکالیس رشد یافته محیط Trypticase soy broth (TSB) استفاده شد. ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی برابر با نیم مک فارلند به گوده های میکروپلیت ۹۶ خانه ای اضافه و در دمای ۳۷°C به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. میکروپلیت سه مرحله توسط آب مقطر استریل شسته و بعد به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت تا خشک شود. بیوفیلیم اتصال یافته با افزودن سافرانین ۰/۱ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه رنگ آمیزی شد. سپس سه مرحله با آب مقطر استریل شسته شد تا رنگ اضافی حذف و بعد از خشک شدن در دمای آزمایشگاه، جذب نوری بیوفیلیم بر روی سطح ته گوده پلیت خشک شده در OD ۴۹۰ با Reader ELISA قرائت گردید. سپس میانگین و انحراف معیار محاسبه شد. از سویه انتروکوکوس فکالیس ATCC ۲۹۲۱۲ به عنوان شاهد استفاده گردید. باکتری های مورد استفاده در محیط کشت TSB به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند، سپس با استفاده از رقت سازی سریالی، استوک باکتری با غلظت 10^6 cfu/ml تهیه 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 چاهک ها ریخته شد، سپس در چاهک اول، ۱۰۰ میکرولیتر از استوک نانو ذره با غلظت MIC-۴ ریخته شد و رقت سازی سری دوتایی انجام گرفت که در پایان غلظت اسید آمینه بر پایه یونی در چاهک ها به ترتیب برابر MIC ۲، 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 به عنوان کنترل نانو ذره در نظر گرفته شد که تنها محیط کشت و غلظت های مختلف نانو ذره در چاهک ها ریخته شد. میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از طی این مدت، محیط کشت موجود در هر چاهک خالی شد، سپس چاهک ها ۳ بار با بافر فسفات استریل (PBS) شسته شدند. پس از آن میکروپلیت ها به صورت وارونه به مدت 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 درجه

سلسیوس قرار گرفت. پس از آن رنگ داخل چاهک ها خارج شد و دوباره شستشو با بافر فسفات استریل انجام گرفت و میکروپلیت ها در دمای اتاق خشک شدند. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۳۰٪ اسید استیک به هر چاهک افزوده شد تا رنگ باند شده با باکتری های تشکیل دهنده بیوفیلیم استخراج شود. سپس جذب نوری این محلول در طول موج ۵۹۵ نانومتر با میکروپلیت ریدر اندازه گیری شد (۱۳).

نتایج

نتایج جداسازی سویه ها

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 جدایه های انتروکوکوس، ویژگی های مورفولوژیک و بیوشیمیایی این باکتری بود. پس از تشخیص، نمونه هایی که خصوصیت های بیوشیمیایی آنها شامل کوکسی های گرم مثبت کاتالاز منفی، تخم مرغی شکل و غیر هاگزا که به صورت جداگانه در دمای ۱۰ تا ۴۵ درجه شد می نمودند به عنوان نمونه مثبت درج گردیدند و کلنی های مربوط ذخیره شدند.

نتایج آزمایش Multiplex PCR جهت شناسایی ژن های بیماری زا

شکل شماره ۱ نتایج واکنش Multiplex PCR را در ۱۲ ایزوله انتروکوکوس فکالیس جدا شده از عفونت های دهانی را نشان می دهد. در این تصاویر می توان باندهای مربوط به ژن های مختلف را در سویه های جدا شده مشاهده کرد. از نمونه های آزمایشگاهی برای شناسایی ژن های کدکننده *cyl*، *esp*، *hyl* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و همچنین سویه انتروکوکوس فکالیس تولید کننده ژن های مورد نظر به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. داده ها نشان داد که در ۲ ایزوله ژن *esp* (۱۶/۶ درصد)، در ۱۱ 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.

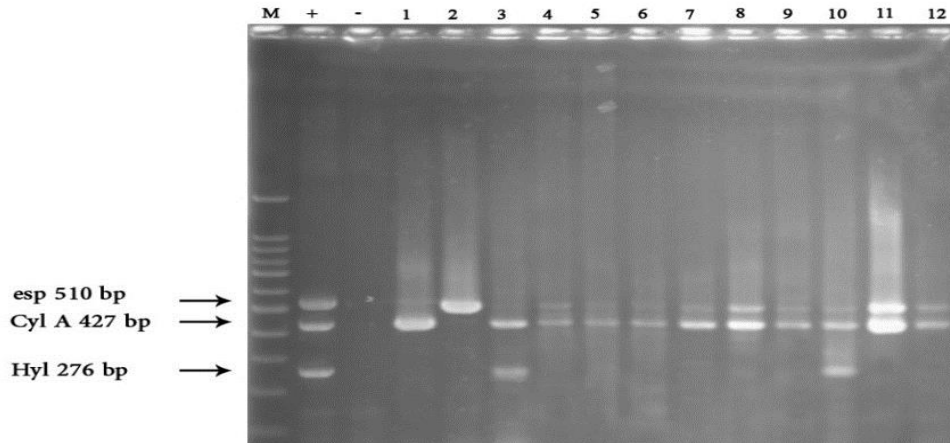
تعیین غلظت MIC و Sub MIC مایع یونی

داده ها نشان داد که غلظت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از مایع یونی قابلیت باکتری سیدال را دارد. هم چنین غلظت $225 \mu\text{g/ml}$ به عنوان غلظت subMIC تعیین گردید.

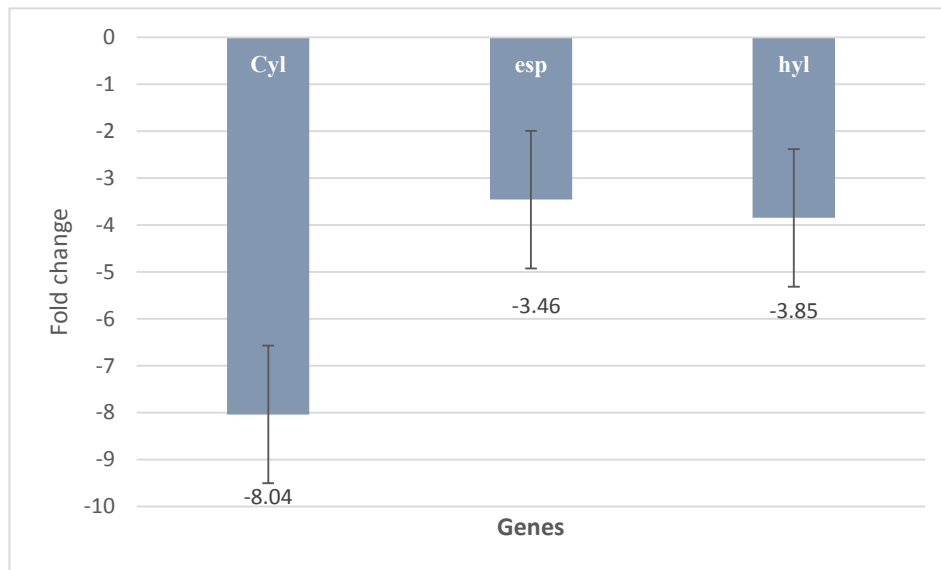
نتایج بررسی بیان ژن

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 به صورت 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 به صورت بسیار معنی‌دار ($p < 0.05$, 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 ($p < 0.05$).



شکل ۱. نتیجه الکتروفورز محصولات MultiplexPCR در ژل آگاروز ۲٪. نمونه ۱ تا ۱۲، به ترتیب 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 ۳۰-۵۹ مشاهده

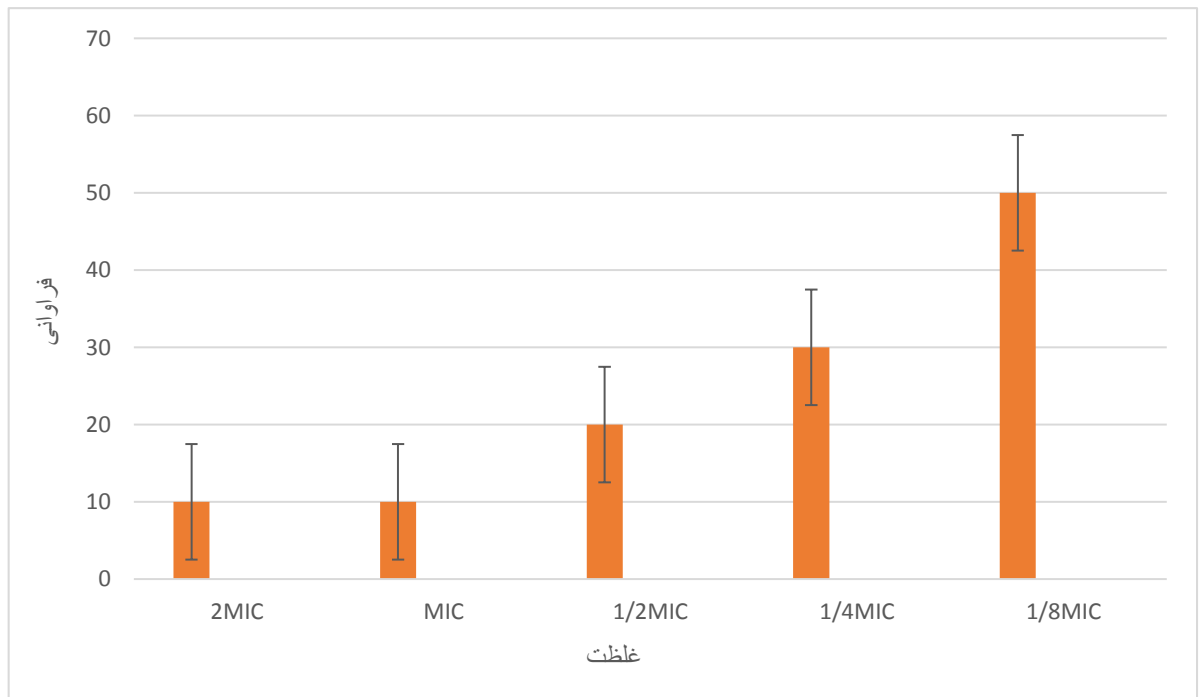
شد. درصد تشکیل بیوفیلم توسط سویه های مورد مطالعه در حضور غلظتهای مختلف مایع یونی در نمودار ۱ نشان داده شده است. همانطور که در نمودار مشاهده می شود، با کاهش غلظت اسید آمینه بر پایه یون، توانایی تشکیل

1/2MIC نیز تولید بیوفیلیم را کاهش دهد ($P < 0.05$).

بیوفیلیم توسط باکتریها افزایش یافت. به عبارت دیگر اسید آمینه بر پایه یون می تواند در غلظت sub-MIC یا همان

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

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



شکل ۱. درصد سوبه‌های مولد بیوفیلیم در غلظت‌های مختلف مایع یونی

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 به‌ضرورت در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. Salehi و همکاران در سال

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

۱۳۹۱، در مطالعه تجربی تعداد ۲۱۴ نمونه کلینیکی شامل ۸۰ نمونه کانتر ادراری 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 ادراری و ژن *esp* در ۱۰۰ نمونه‌های ادرار و ۹۰ درصد از کانترهای ادراری حضور داشتند. میزان مقاومت چند دارویی سویه‌های انتروکوکویی نسبت به 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 *esp* *cyl* *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* *cyl* *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 می‌تواند 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 ژن‌های حدت در زنان بیش‌تر از مردان بود که در راستای داده-

کم‌ترین فراوانی را در ژن *cyl* (۱/۱۶) شناسایی شد، *Hyl* در هیچ‌یک از نمونه‌ها 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، b) و c) 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). علاوه بر 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 ویروالانس شد. Isabelle M و 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 مبتنی بر 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 ضد میکروبی 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 وابسته به گلوکز است. در مطالعه Seno و همکاران ظرفیت تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های دارای پروتئین سطحی به‌طور قابل توجهی بیش‌تر از ایزوله‌های فاقد پروتئین سطحی بود. در صورتی که Trendolkar و همکاران چنین اثر همگرایی را بین ژلاتیناز و پروتئین سطحی *انتروکوک* بر روی تشکیل بیوفیلم نشان ندادند. هم-

تشکیل بیوفیلم ضروری نبوده ولی وجود آن با تشکیل مقادیر بالایی از بیوفیلم همراه بوده است (۱۹). Taghavi Zenouz و 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 میلی لیتر با و بدون لیزر تراپی خاصیت باکتریوسیدال علیه دو باکتری *انتروکوکوس فکالیس* و *سودوموناس ائروژینوزا* دارد و با کاهش غلظت هایپرسین به مقادیر کم تر از ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر خاصیت آنتی باکتریال آن کاهش یافته، میکروارگانیسم ها در محیط کشت رشد نمودند (۲۰).

نتیجه گیری

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که سویه های *انتروکوکوس فکالیس* از نظر ژنتیکی متنوع هستند و این موضوع نشان دهنده شیوع پلی کلونال سویه ها در نمونه های بالینی است. پروتئین های آدهسین می توانند نقش مهمی در ایجاد و انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی داشته باشند. تأثیر مثبت این مطالعه بر روی کاهش بیان ژن های بیماری زا نشان داد که درمان ترکیبی مایع یونی با داروهای ضد میکروبی رایج، اثرات ضد باکتری خوبی را علیه گونه های *انتروکوکوس* نشان می دهند و مایع یونی با حداقل دوز مصرفی می تواند جایگزین مناسبی برای درمان تک دارویی عفونت های *انتروکوکوس*، همراه با جلوگیری از بروز اثرات نامناسب در مراحل درمان، صرفه جویی در مصرف دارو و کاهش هزینه ها باشد.

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, Mulkiwicz E. Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems—a review. *Science of the Total Environment*. 2019;6.97:۱۳۴۰۲۳

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 faecalis* isolated 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 aeruginosa* and *Enterococcus fecalis* using hypericin and methylene blue photosensitizers. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 2016;9(2):443-50.

