Pejouhesh dar Pezeshki (i.e., Research in Medicine) **Original Article**

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2023; Vol. 47; No. 1

Evaluation of the Presence and Time-Variable Expression Levels of *rpoS, relA* and *mazF* Genes during Biofilm Formation in *Staphylococcus epidermidis*

Saeid Kheirjou[1], Farzaneh Hosseini[1*], Framarz Masjedian Jazi[1,2], Elham Siasi Torbati[1]

1. Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: February 02, 2022; Accepted: September 26, 2022

Abstract

Background and Aim: *Staphylococcus epidermidis* is an opportunistic pathogen that is involved in the development of infections associated with the use of implants and medical devices. Biofilm formation is one of the most important virulence factors of this microorganism, which vastly depends on various factors, including different proteins. In the present study, the expression levels of three proteins including *rpoS*, *relA* and *mazF* at different time intervals during the course of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* were investigated.

Methods: In the present case- control study PCR assay was used to detect *rpoS*, *relA* and *mazF* genes in *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Biofilm production was investigated by the microtiter plate (MTP) method. Real- time PCR was used to determine the expression levels of studied genes after 2, 8, and 24 h during the course of biofilm formation. Data were analyzed using GraphPad Prism 8 statistical software (GraphPad Software, Inc.). One- way analysis of variance was used to evaluate the mean expression changes of the studied genes, and P-value < 0.05 was considered significant.

Results: *Staphylococcus epidermidis* contained all the studied genes and had a strong biofilm formation power. The studied genes showed different expression levels at different time intervals during biofilm formation by real- time PCR method. Expression levels of *rpoS* gene were the highest at 24 h (6.7 ± 0.252) ($p < 0.001$), whereas *mazF* gene showed the highest expression level at 8 h (6 ± 0.208) ($p < 0.001$) during the course of biofilm formation. In addition, the expression level of *relA* gene peaked at 2h (3.9 ± 0.361) ($p < 0.001$) and then progressively decreased at 8 (1.7 ± 0.265) and 24h (1.2 ± 0.153) ($p < 0.05$). The results of the comparison of *rpoS* gene expression changes compared to *relA* gene (2.667 ± 1.175) and also *mazF* gene (0.2333 ± 1.175) using Dunnett's multiple comparisons test was not significant ($p > 0.05$).

Conclusion: Our results suggest the importance of *rpoS*, *relA*, and *mazF* proteins in establishing and developing the biofilm structure in the studied strain. In addition, our results showed the important role of *rpoS* protein during biofilm formation and the importance of *relA* protein at the beginning of biofilm formation stages.

Keywords: *Staphylococcus epidermidis*; biofilm formation; Real- time PCR

Please cite this article as: Kheirjou S, Hosseini F, Masjedian Jazi F, Siasi Torbati E. Evaluation of the Presence and Time-Variable Expression Levels of *rpoS*, *relA* and *mazF* Genes during Biofilm Formation in *Staphylococcus epidermidis.* Pejouhesh dar Pezeshki. 2023;47(1):62-69.

[*]**Corresponding Author:** Farzaneh Hosseini; Email: Farzaneh953@yahoo.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-17]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.4.3]

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی-پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی
دوره ۴۷، شماره ۱، سال ۱۴۰۲ شمسی، صفحات ۶۲ تا ۶۹

بررسی حضور و سطح بیان ژن‌های *rpoS*، *relA* و *mazF* در طول تشکیل بیوفیلم در بازه‌های زمانی مختلف در *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*

سعید خیرجو[1]، فرزانه حسینی[1*]، فرامرز مسجدیان جزی[1,2]، الهام سیاسی تربتی[1]

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۰۴

خلاصه

سابقه و هدف: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس پاتوژنی فرصت طلب است که در ایجاد عفونت‌های مرتبط با استفاده از ایمپلنت‌ها و وسایل پزشکی نقش دارد. تشکیل بیوفیلم از جمله مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی این میکروارگانیسم محسوب می‌شود که تا حد زیادی به عوامل مختلفی از جمله پروتئین‌های مختلف بستگی دارد. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی سطح بیان سه پروتئین *rpoS*، *relA* و *mazF* در *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در فواصل زمانی مختلف در طول دوره تشکیل بیوفیلم انجام شد.

روش کار: در مطالعه مورد شاهدی حاضر حضور ژن‌های *rpoS*، *relA* و *mazF* با استفاده از روش PCR در سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ATCC 12228 بررسی شد. میزان تولید بیوفیلم به روش میکروتیترپلیت (MTP) بررسی شد. سطح بیان ژن‌های مورد مطالعه پس از ۲، ۸ و ۲۴ ساعت در طول دوره تشکیل بیوفیلم با استفاده از تکنیک Real- time PCR سنجش شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc) تجزیه و تحلیل شدند. آزمون واریانس یک‌طرفه برای بررسی میانگین تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه استفاده شد و P-value < ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* واجد تمام ژن‌های مد نظر بود و دارای قدرت تشکیل بیوفیلم قوی بود. ژن‌های مورد مطالعه سطوح بیان متفاوتی را در فواصل زمانی مختلف در طول تشکیل بیوفیلم با روش Real- time PCR نشان دادند. سطح بیان *rpoS* در ۲۴ ساعت بالاترین میزان بود (۰/۲۵۲ ± ۶/۷) (p <۰/۰۰۱). در حالی که ژن *mazF* بالاترین سطح بیان را در ۸ ساعت (۰/۲۰۸ ± ۶) (p <۰/۰۰۱) در طول دوره تشکیل بیوفیلم نشان داد. علاوه بر این، سطح بیان ژن *relA* در ۲ ساعت (۰/۳۶۱ ± ۳/۹) (p <۰/۰۰۱) به اوج خود رسید و سپس در ساعت ۸ (۰/۲۶۵± ۱/۷) و ۲۴ (۰/۱۵۳ ± ۱/۲) به تدریج کاهش یافت (p <۰/۰۵). همچنین نتایج مقایسه میزان تغییرات بیان ژن *rpoS* نسبت به ژن *relA* (۱/۱۷۵ ± ۲/۶۶۷) و همچنین ژن *mazF* (۱/۱۷۵ ± ۰/۲۳۳۳) با استفاده از Dunnett's multiple comparisons test معنادار نبود (p >۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج ما اهمیت پروتئین‌های *rpoS*، *relA* و *mazF* را در ایجاد و توسعه ساختار بیوفیلم در سویه مورد بررسی نشان می‌دهد. علاوه بر این، نتایج ما نقش مهم پروتئین *rpoS* را در طول تشکیل بیوفیلم و اهمیت پروتئین *relA* را در آغاز مراحل تشکیل بیوفیلم نشان داد.

واژگان کلیدی: تشکیل بیوفیلم؛ Real-time PCR؛ *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Kheirjou S, Hosseini F, Masjedian Jazi F, Siasi Torbati E. Evaluation of the Presence and Time-Variable Expression Levels of *rpoS*, *relA* and *mazF* Genes during Biofilm Formation in *Staphylococcus epidermidis*. Pejouhesh dar Pezeshki. 2023;47(1):62-69.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات: فرزانه حسینی؛ آدرس پست الکترونیکی: Farzaneh953@yahoo.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.4.3]

مقدمه

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس کوکسی گرم مثبت، فلور نرمال پوست بدن انسان مخصوصاً در زیر بغل، کشاله ران، بین انگشتان پا و روی صورت می‌باشد. این باکتری همچنین قادر به استقرار در سطح غشاهای مخاطی نظیر بینی و بخش فوقانی دستگاه تنفس نیز می باشد (۱). در طی دهه های اخیر، به ویژه با گسترش استفاده از وسایل پزشکی تعبیه شونده در بدن، این باکتری بعنوان پاتوژن بیمارستانی غالب، ظهور کرده و سومین عامل عفونت بیمارستانی می باشد. این باکتری همچنین از عفونت‌هایی نظیر عفونت زخم، خون، مجاری ادرار، اندوکاردیت، باکتریمی، پنومونی، پوست و بافت نرم جدا شده است و قادر به ایجاد استئومیلیت، مننژیت، عفونت داخل چشم و گوش میانی نیز می‌باشد (۲). مهمترین خصوصیت این باکتری در ایجاد بیماری زایی، توانایی این ارگانیسم در تولید بیوفیلم می باشد (۲). توسعه‌ی بیوفیلم باعث مقاومت باکتری نسبت به درمان‌های آنتی‌بیوتیکی شده و می‌تواند منجر به بروز مشکلات حاد در این زمینه شود. در محیط‌های بیمارستانی بیوفیلم میکروبی روی سطوح مختلف به عنوان یک مخزن انتقال عفونت مطرح می‌شوند (۴-۲).

مکانیسم‌هایی مانند بکار گیری ژن‌های دخیل در پاسخ به استرس (SOS response)، سیگما فاکتور S، آلارمون‌هایی مانند ppGpp و یا سیستم‌هایی مانند سیستم های توکسین آنتی‌توکسین، که در شرایط استرس توکسین آزاد شده و فعالیت‌های حیاتی باکتری مانند ترجمه و همانند سازی را مهار می‌کند، باعث ایجاد حالت پرسیست در باکتری می شوند (۷-۵). امروزه مشخص شده که سلول‌های پایدار در ساختار بیوفیلم وجود دارند و به طور کلی مسئول ماندگاری باکتری و ایجاد عفونت‌های مزمن و عود مکرر عفونت‌ها علی رغم درمان‌های ضد میکروبی هستند (۸). نقش پروتئین *rpoS* به عنوان عامل دخیل در ایجاد پاسخ به استرس در تشکیل بیوفیلم در باکتری‌هایی مانند *اشریشیا کلی* (۹) و *سودوموناس آئروژینوزا* (۱۰) مورد بررسی قرار گرفته است. اما تاکنون به نقش این پروتئین در تشکیل بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* پرداخته نشده است.

عامل دیگری که با تشکیل بیوفیلم باکتریایی مرتبط است، سیستم‌های توکسین آنتی توکسین (TA) است (۸). نشان داده شده است که سیستم‌های TA رمزگذاری شده کروموزومی با رویدادهای سلولی مختلف مانند مرگ برنامه ریزی شده سلولی، تشکیل بیوفیلم، ایجاد سلول پایدار در حضور آنتی بیوتیک‌ها و تثبیت DNA ژنومی مرتبط هستند (۱۱، ۱۲). *mazEF* یکی از سیستم‌های TA کدگذاری شده کروموزومی در باکتری‌ها است و چندین مطالعه نقش فیزیولوژیکی مهم هومولوگ‌های *mazF* را نشان داده‌اند (۱۳). با توجه به اهمیت بیوفیلم و نقش عوامل دخیل در تشکیل آن و همچنین ایجاد حالت پایدار در سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و با توجه به اینکه تنها مطالعات انگشت شماری (۱۵، ۱۴) در مورد نقش برخی از این پروتئین ها در *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* انجام شده است، مطالعه حاضر با هدف بررسی سطح بیان ژن‌های کدکننده پروتئین‌های *rpoS*، *relA* و *mazF* در طول تشکیل بیوفیلم در بازه‌های زمانی مختلف در *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* انجام شد.

روش کار

تهیه‌ی سویه مورد مطالعه:

در مطالعه مورد شاهدی حاضراز سویه‌ی استاندارد *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ATCC 12228 تهیه شده از بانک میکروبی دانشگاه علوم پزشکی ایران استفاده شد.

طراحی پرایمر، استخراج DNA و انجام PCR:

استخراج DNA ژنومیک با استفاده از کیت استخراج DNA (Roche ,Germany) صورت گرفت. حضور ژن‌های *rpoS*، *relA* و *mazF* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که در مطالعه حاضر با استفاده از نرم افزارهای الیگو ۷ (oligo 7.60) و پرایمر ۳ (Primer *3* Web) (جدول ۱) طراحی گردید، مورد بررسی قرار گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (مخلوط

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.4.3]

واکنش ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس (Ampliqon Co., Denmark)، ۱میکرولیتر از هر پرایمر و ۱ میکرولیتر DNA باکتری و بقیه آب مقطر استریل) در طی ۳۵ سیکل، شامل: مرحله اولیه بـــاز شـــدن دو رشته DNA به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌سانتی‌گراد، مرحله باز شدن دو رشته DNA ۱دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد، مرحله اتصال پرایمرها به مدت ۱ دقیقه در دمای ۶۰ درجه‌سانتی‌گراد، مرحله طویل‌شدن رشته هدف بـــه مـــدت ۲۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله طویل شدن نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محصول PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱درصد، مورد ارزیابی قرارگرفت (۱۶).

جدول ۱- توالی‌های پرایمرهای طراحی شده.

Genes		Primer sequence (5´ ⟶ 3´)	PS*	Tm (°C)
rpoS	F	ACTGTCTTGCAGCTTCTTGT	100 bp	59
	R	AGCCAAAAAGAGACTGGTGAA		
relA	F	CCTTTAGCACATCGTCTCGGA	131 bp	60
	R	GCTTCGCGTTCACTACGTTT		
mazF	F	GCGGATTTATCACCAGTTCAAGG	149 bp	60
	R	ACGTGGGTTGGTATTTTCGC		
16srRNA	F	CGAACACGTGCTTTGCTTGA	152 bp	60
	R	CCCATACCTGGTCCAACTTCA		

***Product Size**

سنجش میزان تولید بیوفیلم به روش میکروتیترپلیت (MTP):

برای انجام این آزمایش ابتدا نمونه‌ها در محیط جامد کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید، سپس کلنی های تک رشد کرده بر روی محیط جامد به ۵ میلی‌لیتر محیط مایع TSB حاوی ۱٪ گلوکز تلقیح شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس کدورت را به نیم مک فارلند رسانده و از سوسپانسیون تهیه شده ۲۰۰ میکرولیتر داخل چاهک‌های میکروپلیت ریخته و به مدت ۱۸ ساعت دردمای۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید، سپس فازرویی هر چاهک را بیرون ریخته و چاهک‌ها را سه مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل، شست‌وشو داده شد. در مرحله بعد پلیت‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا کاملاً خشک گردید. سپس رنگ‌آمیزی با رنگ کریستال ویوله به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد، رنگ موجود در چاهک‌ها بیرون ریخته شد و پلیت توسط آب شست‌وشو داده شد، در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵٪ به چاهک‌ها افزوده و جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه خوانشگر الایزا(ELISA reader, Oraganon Teknika, هلند) ثبت شد. تولید بیوفیلم نمونه‌ها با توجه جذب نوری نمونه‌ی کنترل منفی (TSB حاوی ۱٪ گلوکز) تفسیر گردید (۱۴).

بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه:

به کمک کیت استخراج RNA (Roche, Germany) و طبق پروتکل شرکت سازنده RNAی سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* همزمان در شرایط تشکیل بیوفیلم با استفاده از کیت Roche استخراج شد. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت تاکارا (Takara, Tokyo, JaPan) انجام شد. از پرایمرهای ذکر شده در جدول ۱ برای تکثیر ژن‌های *RpoS*، *relA* و *mazF* استفاده شد. ژن *16SrRNA* به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. واکنش Real Time PCR به به صورت ۱۲ دقیقه در دمای ۹۵

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.4.3]

درجه‌ی سانتی‌گراد در مرحله اول و سپس ۴۰ سیکل در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه با استفاده از دستگاه Gene thermal Rotor-cycler (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia) انجام گردید. برای محاسبه میزان بیان نسبی ژن‌ها، آنالیزداده‌ها و رسم نمودارهای مربوطه از نرم‌افزار GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc) استفاده شد. نوع روش استفاده شده در این مطالعه برای Real- time PCR نسبی (Relative) و از رنگ سایبرگرین (Ampliqon Co, Denmark) به عنوان شناساگر استفاده گردید. نتایج به روش CTΔΔ یا روش لیواک (Livak method) آنالیز شد. هر تست ۳ بار بصورت مستقل انجام شد (۱۷).

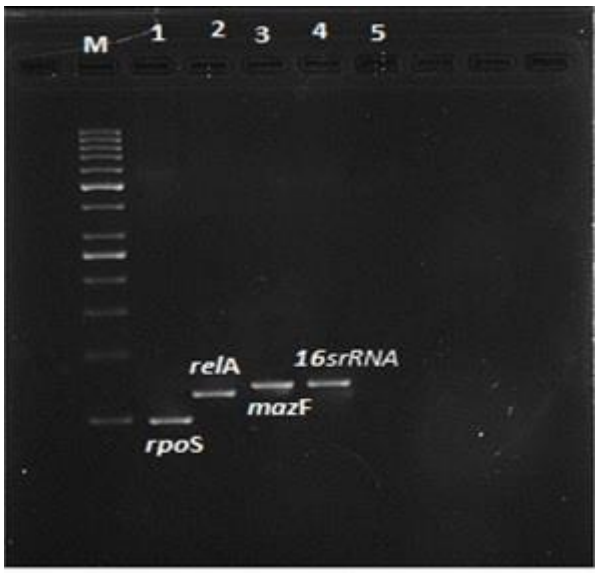
آنالیز آماری:

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. آزمون واریانس یک طرفه برای بررسی میانگین تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه نسبت به نمونه‌ی کنترل در حضور ژن کنترل داخلی *16srRNA* استفاده گردید و P-value < ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد. بررسی آماری POST Hoc برای بررسی ارتباط بین میزان بیان ژن‌های مورد بررسی با یکدیگر مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

یافته‌های حاصل از PCR:

برای تأیید حضور ژن‌های مورد مطالعه در باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* تکنیک PCR انجام شد، سویه‌ی مورد مطالعه واجد تمام ژن‌های مد نظر بود، عکس ژل الکتروفورز ژن‌های مورد مطالعه در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- الکتروفورز محصولات ژن‌های مورد مطالعه باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*

M: مارکر (۱۰۰ bp)، چاهک شماره ۱: ژن *rpoS* (۱۰۰ bp)، چاهک شماره ۲: ژن *relA* (۱۳۱ bp)، چاهک شماره ۳: ژن *mazF* (۱۴۹ bp)، چاهک شماره ۴: ژن 16srRNA (۱۵۲ bp)، NTC: کنترل منفی.

یافته‌های حاصل از تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش میکروتیتر پلیت:

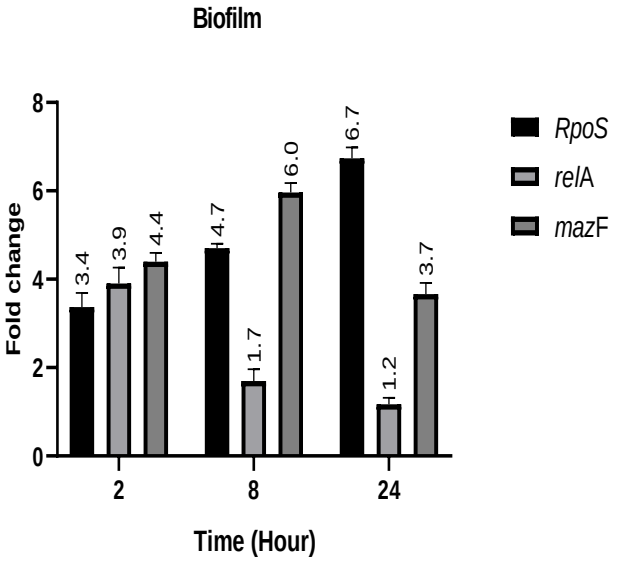
آزمون کمی تولید بیوفیلم برای باکتری سه بار تکرار شد. جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر قرائت شد. تولید بیوفیلم با توجه جذب نوری نمونه‌ی کنترل منفی (TSB حاوی ۱درصد گلوکز) تفسیر گردید. تفسیر نتایج روش میکروتیتر پلیت نشان داد که سویه مورد مطالعه با جذب نوری ۳/۵ قادر به تولید بیوفیلم قوی بود.

یافته‌های حاصل از بیان ژن‌های مورد مطالعه در بیوفیلم:

نتایج حاصل از تکنیک Real- time PCR بر روی ساختار بیوفیلم باکتری نشان داد که بیان ژن *rpoS* در ساعت های ۲، ۸ و ۲۴ پس از تشکیل بیوفیلم نسبت به نمونه‌ی کنترل به ترتیب (۰/۳۲۱ ± ۳/۴)، (۰/۱۰۰ ± ۴/۷) و (۰/۲۵۲ ± ۶/۷) فولد افزایش یافته است (p < ۰/۰۰۱)، که نشان می‌دهد این ژن ممکن است نقش مهمی در تشکیل بیوفیلم باکتری

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.4.3]

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس داشته باشد، همچنین بیان ژن *relA* پس از ۲ ساعت افزایش ۰/۳۶۱± ۳/۹ فولدی را نشان داد ($p < ۰/۰۰۱$) ولی در ساعت‌های ۸ و ۲۴ بیان آن به ۰/۲۶۵± ۱/۷ و ۰/۱۵۳ ± ۱/۲ فولد رسید ($p < ۰/۰۵$). که این نتایج نشان می‌دهد که این ژن ممکن است در آغاز تشکیل بیوفیلم نقش داشته باشد. بیان ژن *mazF* نیز نسبت به نمونه‌ی کنترل افزایش را نشان داد ولی بیان آن در ساعت ۸ (۰/۲۰۸ ± ۶) بیشتر از ساعت های ۲ (۰/۲۰۰ ± ۴/۴) و ۲۴ ساعت (۰/۲۵۲ ± ۳/۷) بود ($p < ۰/۰۰۱$) (نمودار ۱). همچنین نتایج مقایسه میزان تغییرات بیان ژن *rpoS* نسبت به ژن *relA* (۱/۱۷۵ ± ۲/۶۶۷) و همچنین ژن *mazF* (۱/۱۷۵ ± ۰/۲۳۳۳) با استفاده از Dunnett's multiple comparisons test معنادار نبود ($p > ۰/۰۵$).



نمودار ۱- نمودار سنجش بیان ژن‌های مورد مطالعه در بیوفیلم باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* نسبت به نمونه‌ی کنترل ($P < ۰/۰۰۰۱$).

بحث

در مطالعه حاضر نتایج بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه نشان داد که بیان ژن‌های *rpoS* و ژن *mazF* نسبت به ژن *relA* در زمان تشکیل بیوفیلم نسبت به نمونه‌ی کنترل افزایش چشمگیرتری داشتند. بنابراین ممکن است این ژن‌ها در تولید بیوفیلم این باکتری نقش داشته باشند. در یک مطالعه که توسط شیوایی و همکاران در سال ۲۰۱۹ بر روی بیان ژن‌های مختلف انجام شد، گزارش کردند که ژن‌های مختلفی در زمان‌های مختلف تشکیل بیوفیلم باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* نقش دارند، آن‌ها نشان دادند که ژن *mazF* در ساعت‌های مختلف تشکیل بیوفیلم بیان می‌شود ولی بیان آن در ساعت‌های اولیه بیشتر است، همچنین در ادامه گزارش کردند که ژن‌های *altE* و *sdrH* نیز در تشکیل و توسعه‌ی بیوفیلم این باکتری نقش دارد (۱۴)، از این رو با نتایج مطالعه‌ی پیش رو مطابقت دارد. در سال ۲۰۱۷ kato و همکاران نشان دادند که در *استافیلوکوکوس اورئوس* حذف لوکوس ژنی *mazF* باعث افزایش تشکیل بیوفیلم از مسیر وابسته به *ica* می‌شود، آن‌ها گزارش کردند که احتمالا مسیر وابسته به لوکوس ژنی *ica* با تداخل با فعالیت *mazF* در تشکیل بیوفیلم نقش دارد (۱۸)، نتایج مطالعه فوق و مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد، مسیرهای تشکیل بیوفیلم و فعالیت *mazF* ممکن است در گونه‌ی *اورئوس* و *اپیدرمیدیس* متفاوت باشد. بر اساس مطالعات سیستم *mazEF* با ایجاد مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در تشکیل و پایداری ساختار بیوفیلم در باکتری‌ها موثر است (۱۹). بیان ژن *rpoS* نیز در ساختار بیوفیلم در این مطالعه افزایش چشمگیری داشت. ژن *rpoS* که در باکتری‌های گرم منفی بخصوص بعنوان تنظیم‌کننده‌ی حیاتی در فاز سکون و پاسخ در شرایط استرس شناخته می‌شود و باعث فعال شدن ژن‌های زیادی می‌شود، در باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* کمتر بررسی شده و در این مطالعه هم در شرایط تشکیل بیوفیلم مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان دهنده افزایش بیان این ژن در طول تشکیل بیوفیلم بود؛ به طوری که در ساعت‌های ۲، ۸ و ۲۴ پس از تشکیل بیوفیلم نسبت به نمونه‌ی کنترل به ترتیب ۳/۴، ۴/۷ و ۶/۷ فولد افزایش یافته است که نشان می‌دهد این ژن ممکن است نقش مهمی در پیشرفت تشکیل بیوفیلم باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* داشته باشد. همچنین ژن *relA* پس از ۲ ساعت در بالاترین

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-17]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.4.3]

میزان بیان خود قرار داشت. ولی در ساعت‌های ۸ و ۲۴ پس از تشکیل بیوفیلم، بیان آن کاهش یافت، که این نتایج نشان می‌دهد که این ژن ممکن است در آغاز تشکیل بیوفیلم نقش داشته باشد. با این حال مطالعات بیشتری برای بررسی نقش این ژن‌ها در تشکیل بیوفیلم مورد نیاز است. تشکیل بیوفیلم شامل مراحل مختلفی مانند اتصال، تشکیل میکروکلونی و بلوغ بیوفیلم است، اینکه در هر مرحله چه ژن‌هایی و چه مکانیسم‌های نقش دارند دقیق مشخص نشده است و دیتای این مقاله نیز تغییر در بیان ژن‌های مورد مطالعه در ساعت‌های مختلف را نشان می‌دهد و ممکن است شبکه ای از ژن‌ها با هم در این فرایندها همکاری کنند و به طور مثال جدیدا نقش ژن *mazF* که در این مطالعه بررسی شده در تشکیل مراحل مختلف بیوفیلم نشان داده شده است. از جمله محدودیت‌های تحقیق حاضر می‌توان به محدود بودن نمونه‌های مورد بررسی اشاره کرد به طوری که در این مطالعه تنها یک سویه استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. اما از جمله مزایای تحقیق حاضر و استفاده از سویه استاندارد فراهم بودن امکان بررسی بیان ژن‌ها در ساعات مختلف در طول تشکیل بیوفیلم بود.

نتیجه‌گیری

طبق نتایج حاصل از مطالعه حاضر حضور پروتئین‌های مورد بررسی در ایجاد و توسعه ساختار بیوفیلم می‌تواند موثر باشد. علاوه بر این، نتایج ما نقش مهم پروتئین *rpoS* را در طول تشکیل بیوفیلم، و اهمیت پروتئین *relA* را در آغاز مراحل تشکیل بیوفیلم نشان داد. همچنین توصیه می‌شود مطالعات تحلیلی از نوع هم‌گروهی و یا تجربی انجام شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات گرانقدر همکاران آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران کمال تشکر و قدردانی را داریم.

ملاحظات اخلاقی

از آنجایی که در این پژوهش از اطلاعات بیماران استفاده نشده است، ملاحظات اخلاقی رعایت شده است و با سازمان یا شرکتی رابطه کاری نداشتیم و تعارض منافع وجود ندارد.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-17]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.4.3]

References

1. Sabaté Brescó M, Harris LG, Thompson K, Stanic B, Morgenstern M, O'Mahony L, et al. Pathogenic mechanisms and host interactions in *Staphylococcus epidermidis* device-related infection. Frontiers in microbiology. 2017;8:1401.

2. Yannuzzi NA, Patel NA, Relhan N, Tran KD, Si N, Albini TA, et al. Clinical features, antibiotic susceptibilities, and treatment outcomes of endophthalmitis caused by *Staphylococcus epidermidis*. Ophthalmology Retina. 2018;2(5):396-400.

3. Rubini D, Hari BNV, Nithyanand P. Chitosan coated catheters alleviates mixed species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and Candida albicans. Carbohydrate Polymers. 2021;252:117192.

4. Rajabi S, Shivaee A, Khosravi MA, Eshaghi M, Shahbazi S, Hosseini F. Evaluation of multidrug efflux pump expression in clinical isolates of *Staphylococcus. aureus*. Gene Reports. 2020;18:100537.

5. Wilmaerts D, Windels EM, Verstraeten N, Michiels J. General mechanisms leading to persister formation and awakening. Trends in Genetics. 2019;35(6):401-11.

6. Maisonneuve E, Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. Cell. 2014;157(3):539-48.

7. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. Nature Reviews Microbiology. 2007;5(1):48-56.

8. Wen Y, Behiels E, Devreese B. Toxin–Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. Pathogens and disease. 2014;70(3):240-9.

9. Schembri MA, Kjærgaard K, Klemm P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. Molecular microbiology. 2003;48(1):253-67.

10. Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, et al. Gene expression in Pseudomonas aeruginosa biofilms. Nature. 2001;413(6858):860-4.

11. Lobato-Márquez D, Díaz-Orejas R, Garcia-del Portillo F. Toxin-antitoxins and bacterial virulence. FEMS microbiology reviews. 2016;40(5):592-609.

12. Shabazi S, Shivaee A, Nasiri M, Mirshekar M, Sabzi S, Saria OK. Zinc oxide nanoparticles impact the expression of the genes involved in toxin–antitoxin systems in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Journal of Basic Microbiology. 2022.

13. Engelberg-Kulka H, Hazan R, Amitai S. mazEF: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria. Journal of cell science. 2005;118(19):4327-32.

14. Shivaee A, Mohammadzadeh R, Shahbazi S, Pardakhtchi E, Ohadi E, Kalani BS. Time-variable expression levels of mazF, atlE, sdrH, and bap genes during biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. Acta microbiologica et immunologica Hungarica. 2019;66(4):499-508.

15. Kim Y, Wang X, Ma Q, Zhang X-S, Wood TK. Toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae. Journal of bacteriology. 2009;191(4):1258-67.

16. Shivaee A, Mohammadzadeh R, Shahbazi S, Pardakhtchi E, Ohadi E, Kalani BS. Time-variable expression levels of mazF, atlE, sdrH, and bap genes during biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. Acta Microbiol Immunol Hung. 2019;66(4):499-508.

17. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. methods. 2001;25(4):402-8.

18. Kato F, Yabuno Y, Yamaguchi Y, Sugai M, Inouye M. Deletion of mazF increases *Staphylococcus aureus* biofilm formation in an ica-dependent manner. Pathogens and disease. 2017;75(5).

19. Kolodkin-Gal I, Hazan R, Gaathon A, Carmeli S, Engelberg-Kulka H. A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for mazEF-mediated cell death in *Escherichia coli*. Science (New York, NY). 2007;318(5850):652-5.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-17]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.4.3]