

Evaluation of *Shigella flexneri* Biofilm Formation and Its Effect on the Expression of Toxin-antitoxin Genes

Erfan Kheradmand¹, Shabnam Razavi^{2,3*} , Malihe Talebi^{2,3} , Mahmoud Jamshidian⁴

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Microbial Biotechnology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

 [10.30699/ijmm.15.5.538](https://doi.org/10.30699/ijmm.15.5.538)



ABSTRACT

Background and Aim: *Shigella flexneri* is a highly contagious Gram-negative bacterium that causes severe diarrhea, especially in children under ten years old. The biofilm formation in this species increases its resistance to antibiotics. Given the important role of toxin-antitoxin (TA) systems in the stability and survival of bacteria under stress condition, this study was aimed to evaluate the expression of genes encoding TA systems and Lon protease (*lonp*) as the main protein regulating the expression and function of these systems in this microorganism in terms of biofilm formation.

Materials and Methods: In this study, the standard *Shigella f.* ATCC 12022 was used. After the bacteria culture on the specific culture medium, the ability to form biofilm was quantitatively evaluated by microtiter plate method. Then, the expression level of the mentioned genes was assessed compared to the control group using real-time PCR.

Results: The results of microtiter plate test showed that the studied *Shigella f.* was a strong biofilm strain. The qPCR results showed an increase in gene expression of the studied toxins and Lon protease at 8 and 24 h following biofilm formation induction ($P < 0.01$).

Conclusion: Due to the significant increase in the expression of the studied genes, especially *Lon protease*, *GNAT* and *maz* toxins at 24 h after biofilm formation, they can be potentially used as antimicrobial targets in new studies.

Keywords: Biofilm, Microtiter plate, Real-Time PCR, *Shigella flexneri*, Toxin-antitoxin

Received: 2021/04/24;

Accepted: 2021/08/09;

Published Online: 2021/09/10

Corresponding Information:

Shabnam Razavi, Microbial Biotechnology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email: razavi.sh@iums.ac.ir



Copyright © 2021. This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.



Use your device to scan and read the article online

Kheradmand E, Razavi S, Talebi M, Jamshidian M. Evaluation of *Shigella flexneri* Biofilm Formation and Its Effect on the Expression of Toxin-antitoxin Genes. Iran J Med Microbiol. 2021; 15 (5) :538-550

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

Introduction

Shigella flexneri is a low-dose infectious microorganism that swallowing a small number of it (about 100 bacteria/ml) can cause infection. This is the main reason for the high prevalence of the disease, which is estimated for 165 million infected people and 1.1 million deaths worldwide per year (1, 2). Similar to other diarrheal diseases, shigellosis is treated with intravenous serum injection. *Shigella* infections respond to the antibiotic treatment by reducing fever and diarrhea, but there have been several reports of the antibiotic resistance (3). Therefore, to deal with

the infectious agents resistant to antibiotics several studies must be conducted on pathogenicity, ways to escape the immune system, and resistance to antibiotics. In this study, the biofilm formation of *Shigella f.* and its association with the changes in the expression of TA (Toxin-Antitoxin) genes were investigated (4, 5).

Biofilms are aggregates of microbial colonies that form a cellular matrix containing a protective polysaccharide layer. The biofilm formation is the

major factor involved in bacterial survival and resistance (6). In general, bacterial resistance in biofilm condition is much higher than planktonic state; one of the main reasons for this resistance is the polysaccharide matrix, which prevents the antibiotics penetration. In addition, lower level of bacterial metabolic activity in biofilm is another reason for the resistance to antibiotics (7).

Studies on *Shigella f.* have shown that prolonged exposure of the bacterium to the bile salts leads to biofilm formation (8). In addition, salt concentration can significantly affect the capacity of *Shigella* to produce biofilm in microplate wells (9). Ferulic acid has also been reported to limit the formation of biofilms by *Shigella f.* (10). These indicate the effect of different salts and acids on the biofilm formation of this bacterium.

On the other hand, in the case of TA systems, recent studies have shown that under stress condition, antitoxin is selectively degraded, which causes toxin activation and function (11, 12). It has been suggested that toxins in these systems are associated with various cellular processes such as regulating gene expression (13).

Several evidences have shown that these systems are involved in the formation of biofilm and Quorum sensing (14, 15). Lon protease is a protected and ATP-dependent serine protease in bacteria that selectively degrades mutated and abnormal proteins as well as some short-lived regulatory proteins such as antitoxins. Thus, by releasing the toxin it is activated. This protease plays a pivotal role in different bacterial mechanisms, including cell differentiation, participation in biofilm production, and bacterial survival (16, 17).

Since there was not much information about the existence and prevalence of these systems in *Shigella f.*, and due to the regular updating of the databases related to these systems, we evaluated the expression of these genes in the cell culture following cell infection by *Shigella f.* during a study after the identification of TA systems by these databases as well as the design of specific sequences of the related primers with the help of authentic software. This study was conducted in line with our previous study (18). The aim of this study was to investigate the changes in gene expression compared to the control by examining the biofilm of *Shigella f.*

Materials and Methods

Bacterial Preparation and DNA Extraction

This study was performed in 2019 in the laboratories of Iran University of Medical Sciences. The standard strain of *Shigella f.* (ATCC 12022) was prepared from the Microbial Bank of the Department of Microbiology,

Iran University of Medical Sciences. The bacteria was cultured on Hektoen enteric agar (HEK) (Merck, Germany) and incubated at 37°C for 24 hr. The boiling method was used to extract genomic DNA (19). The quality and concentration of the extracted DNA were evaluated by Nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, De, USA). After reading the adsorption ratio of 260/280 and ensuring the purity of DNA, the sample was stored in a sterile microtube at -70°C for further use.

Polymerase chain Reaction and Electrophoresis

PCR was performed in a thermal cycler (Bio-Rad, USA) using Master Mix (Fermentas, Lithuania) (12.5 µL) and extracted DNA (1 µL). The specific forward and reverse primers were used at 10 pM concentration (1 µL/each) (18). The final volume reached to 25 µL using nuclease-free water. The cycling program was as follow: an initial denaturation step at 95°C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 60°C for 1 min, and extension at 72°C for 25 sec, and a final elongation phase at 72°C for 5 min. The PCR products were electrophoresed on 2% agarose gel. For this purpose, 2 gr of agarose powder (Sigma-Aldrich) was dissolved in 100 ml of 0.5X TBE buffer. After gel preparation and adding DNA Safe Stain, it was transferred to the tank and the samples were loaded in the wells. Finally, the bands were examined and photographed using gel doc.

Quantitative Evaluation of Biofilm Formation by Microtiter Plate Method

Shigella f. was cultured in trypticase soy broth (TSB) medium containing 1% glucose for 24 h at 37°C, and then a suspension equivalent to half McFarland was prepared. Then, 200 µL was inoculated into the wells of 96-well microplate. After incubation for 24 h at 37°C, the wells were washed three times with PBS to remove unabsorbed bacteria. The absorbed bacteria were then fixed for 15 min using 95% ethanol and the plate was air dried. The wells were stained with 200 µL of 0.02% crystal violet for 5 min. The microplate was then washed twice with distilled water to remove the excess dye. After drying, 200 µL of 33% glacial acetic acid was added. Following the contents fixation with ethanol, the adsorption of the dye dissolved in acetic acid was measured at 492 nm wavelength. The culture medium alone was used as negative control. Thus, to quantitatively evaluate the ability of *Shigella f.* to produce biofilm, the average adsorption of three wells was calculated and compared with the average adsorption of three control wells (uncultivated medium). The ability of bacteria to produce biofilm was determined. The ability to form biofilm was obtained through Table 1. To ensure the accuracy of the work, these tests and measurements were repeated thrice at different times (20).

Table 1. Calculating the ability of biofilm formation compared to the control

Degree of biofilm production	Intensity of colorimetry
Lack of production	$OD < OD_{nc}$
Weak	$OD_{nc} < OD < 2 \times OD_{nc}$
Medium	$2 \times OD_{nc} < OD < 4 \times OD_{nc}$
Strong	$4 \times OD_{nc} < OD$

Investigation of Gene Expression in Biofilm using qPCR and Livak Method

At 8 and 24 h after induction of biofilm formation in *Shigella f.*, total RNA was extracted using RNA extraction kit (Roche, Germany). To measure the concentration and purity of RNA, the amount of optical density was read using nanodrop. After ensuring the purity of the extracted RNA, cDNA was synthesized using cDNA synthesis kit (GeneAll Biotechnology, South Korea). The 16S rRNA gene was used for the data normalization. Then, the expression of the studied genes was measured in the presence of internal control gene compared to the control sample. All experiments were performed thrice.

Each sample was done in duplicate. For each gene, two microtubes without template were placed to ensure the absence of contamination. To prepare the reaction mix with a total volume of 20 μ L, 5 μ L of sybr green Master Mix (qPCR Master Mix, Bioneer, Korea), 1 μ L of cDNA, specific forward and reverse primers with 10 pM concentration (0.5 μ L/each) and 13 μ L nuclease-free water was used. All the steps were performed on ice. After spinning for 10 sec, samples were placed inside Rotor Gene thermal cycler (Corbett, Australia). The thermal cycling consisted of an initial activation step at 95°C for 10 min, 45 cycle of denaturation at 95°C for 15 sec, annealing and extension at 60°C for 30 sec. Real-time PCR results were analyzed using Rest software and the amount of gene expression (fold change) was calculated using Livak method (18, 21).

Statistical Analysis

All data was presented based on three replications in each experiment and the mean of the measurements was performed in three replications and its statistical analysis was determined by analysis

of variance (ANOVA) and P-value < 0.01 using SPSS 22 (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA).

Results

Polymerase Chain Reaction Test Result

The PCR results shown in Figure 1, confirmed the presence of TA systems genes (from left to right, toxin and then antitoxin, respectively), as well as Lon protease (*lonp*) in the studied *Shigella f.* strain.

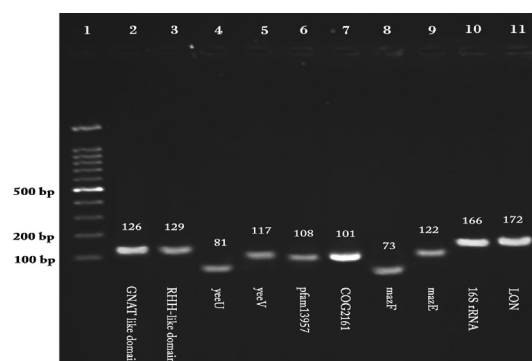


Figure 1. PCR results of the studied genes in *Shigella flexneri* strain

Results of *Shigella f.* Biofilm Formation and Genes Expression

The ability of the studied *Shigella f.* strain to produce biofilm was evaluated by microtiter plate method using ELISA reader. The results showed that the tested strain was able to produce biofilm strongly. The qPCR results showed a fold increase in the expression of TA systems and *lonP* genes at 8 and 24 h after biofilm formation compared to the control. The results of the expression of the studied genes in the mentioned hours are shown in Figures 2 and 3, respectively ($P < 0.01$).

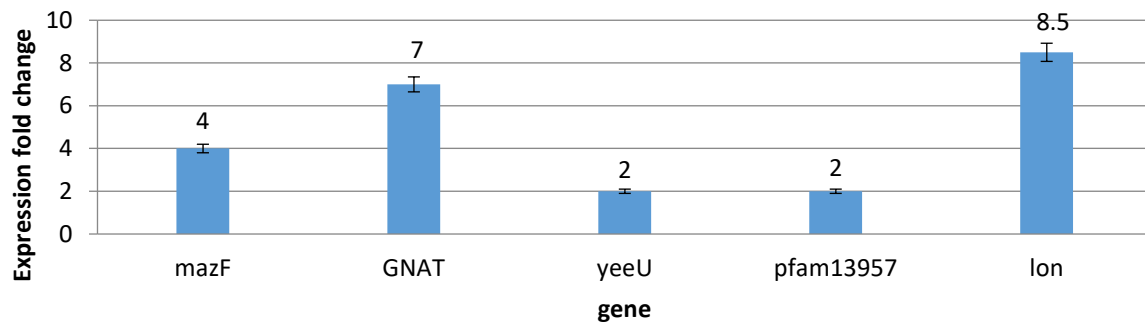


Figure 2. Results of expression of the studied genes in biofilm conditions compared to the control sample at 8 hour (results normalized in the presence of 16S rRNA internal control gene) ($P < 0.01$)

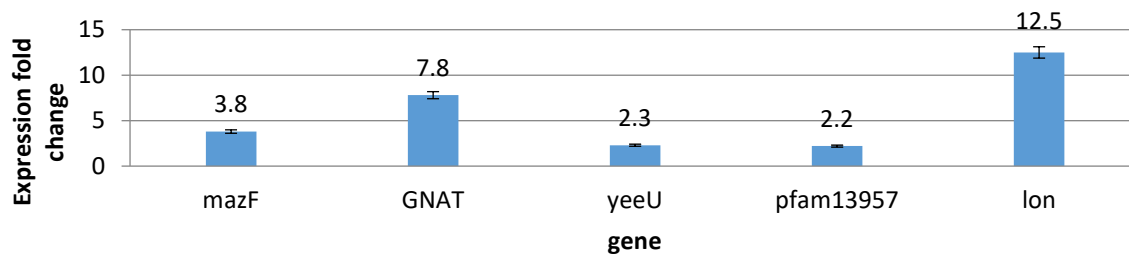


Figure 3. Results of expression of the studied genes in biofilm conditions compared to the control sample at 24 hour (results normalized in the presence of 16S rRNA internal control gene) ($P < 0.01$)

Discussion

According to the obtained results for the TA systems increased expression level in terms of biofilm formation, it is possible to understand the association between these systems and biofilm formation. Hemati *et al.*, in 2014, using PCR method, showed that in the clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, which have a high ability to form biofilms, TA systems and Quorum sensing genes are abundant (22), which indicates the association of biofilm formation with the presence of TA systems. This is consistent with the results of our study. In a study in 2016, Wood *et al.*, identified a type II TA system called HigB/HigA in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 and showed that HigB toxin affects biofilm production and virulence factors, and thus this system affects the pathogenicity of this strain (23).

In 2017, Valadbeigi *et al.*, investigated the effect of a compound called PNA on the expression of the *mazE* antitoxin gene and its effect on biofilm formation in 18 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. They mentioned that *mazE* antitoxin gene could be targeted for controlling the biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* (24).

In 2018, Chan *et al.*, identified four TA systems, including *pezAT*, *yefM-yoeB*, *relBE*, and *phD-doc* in *Streptococcus pneumoniae*. They showed that strains

lacking the *yefM-yoeB* system, as well as mutants in both *yefM-yoeB* and *relBE* systems, had a significant reduction in biofilm formation ability (25). This indicates that, similar to our results, there is a significant association between the presence of some TA systems and biofilm formation.

In a study in 2019, Alhousseini *et al.*, examined 54 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* MDR and evaluated the presence of five type II TA systems, including *relBE*, *hipBE*, *mazE*, *ccdAB*, and *mqsR*. They observed biofilm formation in 90.74% of the isolates. Also, PCR results for identifying the gene loci of TA systems showed a very high percentage of these systems in the studied isolates (26). These results were similar to the present study outcome.

In a study by Ma *et al.*, in 2019 conducted on 3 strains of *Staphylococcus aureus*, the role of the MazEF system in infections as well as the association between this system and increased biofilm growth was demonstrated (27).

Numerous results of other bacteria have shown that maz toxin helps bacteria survive in harsh conditions. This system was also present in our studied strain. In *Myxococcus xanthus*, a Gram-negative bacterium, MazF plays an important role. It is induced by the

formation of a spore-producing body, resulting in the death of 80% of the cell population by cell lysis and the remaining 20% of the cells are capable of forming spore-producing bodies (28).

Kwan *et al.*, in a study in 2015, examined the MqsR/MqsA type II system in *Escherichia coli* and showed that due to the high concentration of deoxycholate in the gallbladder and upper intestine, this system is physiologically important and vital for the growth and survival of *Escherichia coli* cells in these areas, which have a high concentration of bile salts (29).

Targeting the important toxins and their regulating protease is suggested as an appropriate method of treatment. One method to target a gene is antisense technology. Javanmard *et al.*, in a study in 2020, designed and applied antisense against *cagA* gene in *Helicobacter pylori* and showed that antisense along with penetrating peptide could be used as an effective tool to inhibit the target gene mRNA (30).

Conclusion

In the present study, the expression of genes was evaluated in biofilm condition compared to the control with lack of biofilm formation. The results showed that *GNAT* and *maz* toxins genes expression had a significant increase in biofilm conditions

compared to the control group. These results suggest that these two systems may contribute to the formation of biofilms. In addition, due to the increased expression of *Lon protease* gene, its importance and necessity in bacterial survival can be realized through regulation and control of TA systems in biofilm conditions. Therefore, this protein can be a favorable target for introducing new therapeutic compounds.

Acknowledgment

We would like to express our gratitude to all the people who cooperated effectively during this study. It is worth mentioning that this article is the result of a part of Mr. Erfan Kheradmand's doctoral dissertation from the Islamic Azad University, Science and Research Branch.

Funding

This article is an independent study that was conducted without organizational financial support.

Conflict of Interest

The authors declared no conflict of interest.

References

- Baker S, The HC. Recent insights into Shigella: a major contributor to the global diarrhoeal disease burden. *Curr Opin Infect Dis.* 2018;31(5):449-54. [PMID] [PMCID] [DOI:10.1097/QCO.0000000000000475]
- Schroeder NG, Hilbi H. Molecular Pathogenesis of Shigella spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(1):134-56. [DOI:10.1128/CMR.00032-07] [PMID] [PMCID]
- Tajbakhsh M, García Migura L, Rahbar M, Svendsen CA, Mohammadzadeh M, Zali MR, et al. Antimicrobial-resistant Shigella infections from Iran: an overlooked problem? *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(5):1128-33. [DOI:10.1093/jac/dks023] [PMID]
- Xu D, Zhang W, Zhang B, Liao C, Shao Y. Characterization of a biofilm-forming Shigella flexneri phenotype due to deficiency in Hep biosynthesis. *PeerJ.* 2016;4:e2178. [DOI:10.7717/peerj.2178] [PMID] [PMCID]
- Kang J, Liu L, Liu M, Wu X, Li J. Antibacterial activity of gallic acid against Shigella flexneri and its effect on biofilm formation by repressing mdoH gene expression. *Food Control.* 2018;94:147-54. [DOI:10.1016/j.foodcont.2018.07.011]
- Højby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(4):322-32. [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011] [PMID]
- Dadgar T, Vahedi Z, Yazdansetad S, Kiaei E, Asaadi H. Phenotypic Investigation of Biofilm Formation and the Prevalence of icaA and icaD Genes in Staphylococcus epidermidis Isolates. *Iran J Med Microbiol.* 2019;12(6):371-81. [DOI:10.30699/ijmm.12.6.371]
- Nickerson KP, Chanin RB, Sistrunk JR, Rasko DA, Fink PJ, Barry EM, et al. Analysis of Shigella flexneri Resistance, Biofilm Formation, and Transcriptional Profile in Response to Bile Salts. *Infect Immun.* 2017;85(6):e0106716. [DOI:10.1128/IAI.01067-16] [PMID] [PMCID]

9. Ellafi A, Abdallah FB, Lagha R, Harbi B, Bakhrouf A. Biofilm production, adherence and morphological alterations of *Shigella* spp. under salt conditions. *Ann Microbiol.* 2011;61(4):741-7. [DOI:10.1007/s13213-010-0190-5]
10. Kang J, Liu L, Liu Y, Wang X. Ferulic Acid Inactivates *Shigella flexneri* through Cell Membrane Destruction, Biofilm Retardation, and Altered Gene Expression. *J Agric Food Chem.* 2020;68(27):7121-31. [DOI:10.1021/acs.jafc.0c01901] [PMID]
11. Yamaguchi Y, Park J-H, Inouye M. Toxin-Antitoxin Systems in Bacteria and Archaea. *Annu Rev Genomics.* 2011;45(1):61-79. [DOI:10.1146/annurev-genet-110410-132412] [PMID]
12. Goeders N, Van Melderen L. Toxin-Antitoxin Systems as Multilevel Interaction Systems. *Toxins.* 2014;6(1):304-24. [DOI:10.3390/toxins6010304] [PMID] [PMCID]
13. Yamaguchi Y, Inouye M. Chapter 12 mRNA Interferes, Sequence-Specific Endoribonucleases from the Toxin-Antitoxin Systems. *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* 85: Academic Press; 2009. p. 467-500. [DOI:10.1016/S0079-6603(08)00812-X]
14. Wen Y, Behiels E, Devreese B. Toxin-Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. *Pathog Dis.* 2014; 70(3):240-9. [DOI:10.1111/2049-632X.12145] [PMID]
15. Karimi S, Ghafourian S, Taheri Kalani M, Azizi Jalilian F, Hemati S, Sadeghifard N. Association between toxin-antitoxin systems and biofilm formation. *Jundishapur J Microbiol.* 2014;8(1):e14540. [DOI:10.5812/jjm.14540] [PMID] [PMCID]
16. Christensen SK, Maenhaut-Michel G, Mine N, Gottesman S, Gerdes K, Van Melderen L. Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in *Escherichia coli*: involvement of the yefM-yoeB toxin-antitoxin system. *Mol Microbiol.* 2004;51(6):1705-17. [DOI:10.1046/j.1365-2958.2003.03941.x] [PMID]
17. Venkatesh S, Lee J, Singh K, Lee I, Suzuki CK. Multitasking in the mitochondrion by the ATP-dependent Lon protease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2012;1823(1):56-66. [DOI:10.1016/j.bbamcr.2011.11.003] [PMID] [PMCID]
18. Kheradmand E, Razavi S, Talebi M, Jamshidian M. Evaluation of Putative Type II Toxin-Antitoxin Systems and Lon Protease Expression in *Shigella flexneri* Following Infection of Caco-2 Cells. *Archives of Clinical Infectious Diseases.* 2020;15(3):e98625. [DOI:10.5812/archcid.98625]
19. Hearn RP, Arblaster KE. DNA extraction techniques for use in education. *Biochem Mol Biol Educ.* 2010;38(3):161-6. [DOI:10.1002/bmb.20351] [PMID]
20. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura GD, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 2007;115(8):891-9. [DOI:10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x] [PMID]
21. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):95-125. [DOI:10.1016/j.mam.2005.12.007] [PMID]
22. Hemati S, Azizi-Jalilian F, Pakzad I, Taherikalani M, Maleki A, Karimi S, et al. The correlation between the presence of quorum sensing, toxin-antitoxin system genes and MIC values with ability of biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran J Microbiol.* 2014;6(3):133-9.
23. Wood TL, Wood TK. The HigB/HigA toxin/antitoxin system of *Pseudomonas aeruginosa* influences the virulence factors pyochelin, pyocyanin, and biofilm formation. *MicrobiologyOpen.* 2016;5(3):499-511. [DOI:10.1002/mbo3.346] [PMID] [PMCID]
24. Valadbeigi H, Sadeghifard N, Salehi MB. Assessment of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by antisense mazE-PNA. *Microb Pathog.* 2017;104:28-31. [DOI:10.1016/j.micpath.2017.01.009] [PMID]
25. Chan W, Domenech M, Moreno-Córdoba I, Navarro-Martínez V, Nieto C, Moscoso M, et al. The *Streptococcus pneumoniae* yefM-yoeB and relBE Toxin-Antitoxin Operons Participate in Oxidative Stress and Biofilm Formation. *Toxins.* 2018;10(9):378. [DOI:10.3390/toxins10090378] [PMID] [PMCID]
26. Alhusseini LB, Maleki A, Kouhsari E, Ghafourian S, Mahmoudi M, Al Marjani MF. Evaluation of type II toxin-antitoxin systems, antibiotic resistance, and biofilm production in clinical MDR *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Iraq. *Gene Rep.* 2019;17:100546. [DOI:10.1016/j.genrep.2019.100546]

27. Ma D, Mandell JB, Donegan NP, Cheung AL, Ma W, Rothenberger S, et al. The Toxin-Antitoxin MazEF Drives *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation, Antibiotic Tolerance, and Chronic Infection. *mBio*. 2019;10(6):e0165819. [\[DOI:10.1128/mBio.01658-19\]](https://doi.org/10.1128/mBio.01658-19)
28. Sjøgaard-Andersen L, Yang Z. Programmed Cell Death: Role for MazF and MrpC in *Myxococcus* Multicellular Development. *Curr Biol*. 2008;18(8):R337-R9. [\[DOI:10.1016/j.cub.2008.02.060\]](https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.02.060) [\[PMID\]](#)
29. Kwan BW, Lord DM, Peti W, Page R, Benedik MJ, Wood TK. The MqsR/MqsA toxin/antitoxin system protects *Escherichia coli* during bile acid stress. *Environ Microbiol*. 2015;17(9):3168-81. [\[DOI:10.1111/1462-2920.12749\]](https://doi.org/10.1111/1462-2920.12749) [\[PMID\]](#)
30. Javanmard Z, Kalani BS, Razavi S, Farahani NN, Mohammadzadeh R, Javanmard F, et al. Evaluation of cell-penetrating peptide-peptide nucleic acid effect in the inhibition of *cagA* in *Helicobacter pylori*. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2020;67(1):66-72. [\[DOI:10.1556/030.66.2019.032\]](https://doi.org/10.1556/030.66.2019.032) [\[PMID\]](#)



ارزیابی تشکیل بیوفیلم شیگلا فلکسنری و تأثیر آن بر بیان ژن‌های توکسین-آنتی‌توکسین

عرفان خردمندا^۱، شبمن رضوی^{۲،۳}، ملیحه طالبی^{۲،۳}، محمود جمشیدیان^۴

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۳. گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۴. گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: شیگلا فلکسنری، باکتری گرم منفی بسیار مسری است که باعث اسهال شدید بخصوص در کودکان زیر ده سال می‌شود. تشکیل بیوفیلم در این گونه سبب افزایش مقاومت آن در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها می‌گردد. با توجه به نقش مهم سیستم‌های توکسین-آنتی‌توکسین (TA) در پایداری و بقای باکتریها تحت شرایط استرس، هدف مطالعه حاضر، ارزیابی بیان ژن‌های کدکننده سیستم‌های TA و همچنین Lon پروتئاز به‌عنوان پروتئین اصلی تنظیم‌کننده بیان و عملکرد سیستم‌های مذکور در این میکروارگانیسم در شرایط تشکیل بیوفیلم است.

مواد و روش کار: در این مطالعه، از سویه استاندارد شیگلا فلکسنری ATCC 12022 استفاده شد. پس از کشت باکتری روی محیط کشت اختصاصی، توانایی تشکیل بیوفیلم به صورت کمی به روش میکروتیتراپلریت ارزیابی شد. در ادامه سطح بیان ژن‌های مذکور نسبت به گروه کنترل با استفاده از ریل تایم PCR ارزیابی گردید.

یافته‌ها: نتایج تست میکروتیتراپلریت نشان داد که باکتری شیگلا فلکسنری مورد مطالعه یک سویه بیوفیلم قوی است و نتایج qPCR حاکی از افزایش بیان ژن‌های توکسین‌های مورد مطالعه و Lon پروتئاز، ۸ و ۲۴ ساعت پس از القای تشکیل بیوفیلم بود ($P < 0.01$).

نتیجه‌گیری: با توجه به افزایش معنی‌دار میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه بخصوص Lon پروتئاز و توکسین‌های GNAT و maz در ساعت ۲۴ پس از تشکیل بیوفیلم، می‌توانند به‌طور بالقوه به‌عنوان هدف داروی ضد میکروبی در مطالعات جدید مورد استفاده قرار گیرند.

کلیدواژه‌ها: شیگلا فلکسنری، بیوفیلم، میکروتیتراپلریت، توکسین-آنتی‌توکسین، ریل تایم PCR
کپی‌رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران: دسترسی آزاد، کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۴

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۸

انتشار آنلاین: ۱۴۰۰/۰۶/۱۹

موضوع: باکتری‌شناسی پزشکی

نویسنده مسئول:

شبمن رضوی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

ایمیل:

razavi.sh@iums.ac.ir

مقدمه

به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، برای مقابله با عوامل عفونی ابتدا باید مطالعات زیادی بر روی بیماری‌زایی، راه‌های فرار از سیستم ایمنی و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها انجام شود. در همین راستا در این مطالعه به بررسی بیوفیلم باکتری شیگلا فلکسنری و ارتباط آن با تغییرات بیان ژن‌های TA (Toxin-Antitoxin) پرداخته شد (۵، ۴).

بیوفیلم‌ها تجمعی از کلنی‌های میکروبی هستند که سبب تشکیل یک ماتریکس سلولی می‌شوند که دارای یک لایه محافظ پلی‌ساکاریدی است و تشکیل بیوفیلم عامل اصلی دخیل در بقا و مقاومت باکتریایی است (۶). به‌طور کلی مقاومت باکتریایی در

شیگلا فلکسنری میکروارگانیسمی با دوز عفونت‌زایی پایین است که بلع تعداد اندکی از آن (حدود ۱۰۰ عدد باکتری در میلی‌لیتر) می‌تواند سبب عفونت گردد و این موضوع دلیل اصلی قدرت زیاد سرایت این بیماری است به‌طوری‌که تخمین زده می‌شود که در هر سال ۱۶۵ میلیون نفر در تمام جهان با شیگلا عفونی می‌شوند و این بیماری، منجر به حدود ۱/۱ میلیون مرگ و میر می‌گردد (۱).
(۲). مشابه با سایر بیماری‌های اسهالی، در شیگلوز نیز درمان با تزریق مایع‌های سرمی درون رگی صورت می‌گیرد. عفونت‌های شیگلایی به درمان آنتی‌بیوتیکی با کاهش در میزان تب و اسهال جواب می‌دهند اما گزارش‌های زیادی در مورد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری مطرح شده است (۳). بنابراین با توجه

در این مطالعه بررسی تغییرات بیان ژن‌ها با بررسی بیوفیلیم باکتری شیگلا فلکسنری نسبت به کنترل است.

مواد و روش‌ها

آماده سازی باکتری و استخراج DNA

این مطالعه در سال ۲۰۱۹ و در آزمایشگاه‌های دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام گرفت. سویه استاندارد شیگلا فلکسنری (ATCC 12022) از بانک میکروبی دانشکده میکروبی شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران تهیه شد. جهت آماده سازی، سویه مورد مطالعه بر روی محیط کشت هکتون انتریک آگار (Merck, Germany) کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. برای استخراج DNA ژنومی از روش جوشاندن (Boiling) استفاده شد (۱۹). در ادامه کیفیت و غلظت DNA استخراج شده، توسط دستگاه نانودراپ (Nanodrop Technologies, Wilmington, De, USA) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین ترتیب پس از خوانش نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ و حصول اطمینان از خلوص DNA، نمونه در یک ویال استریل در دمای ۷۰- درجه سلسیوس برای استفاده ذخیره گردید.

واکنش زنجیره ای پلیمرز و الکتروفورز

PCR در دستگاه ترمال سایکلر (Bio-Rad, USA) با استفاده از مسترمیکس (Fermentas, Lithuania) به میزان ۱۲/۵ میکرولیتر و DNA استخراج شده به میزان ۱ میکرولیتر انجام گرفت. در این مطالعه از پرایمرهای اختصاصی مستقیم و برگشتی با غلظت ۱۰ پیکومول از هر کدام ۱ میکرولیتر استفاده شد (۱۸) و حجم نهایی با استفاده از آب مقطر استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس در دستگاه بر طبق برنامه مورد نظر، مراحل تنظیم و زماندهی شدند. به این ترتیب که یک مرحله واسرشتگی اولیه 95°C به مدت ۵ دقیقه و 35°C سیکل حرارتی شامل مرحله واسرشتگی 95°C به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال 60°C به مدت ۱ دقیقه و مرحله تکثیر 72°C به مدت ۲۵ ثانیه و یک مرحله طویل سازی نهایی 72°C به مدت ۵ دقیقه لحاظ گردید. الکتروفورز محصولات PCR توسط ژل ۲٪ صورت گرفت. بدین منظور ۲ گرم از پودر آگارز (Sigma-Aldrich) در ۱۰۰ میلی لیتر بافر TBE 0.5X حل شد. پس از آماده سازی ژل و اضافه کردن DNA Safe Stain به آن و انتقال به تانک، نمونه‌ها در چاهک‌ها لود شدند. در نهایت باندها با استفاده از ژل داک بررسی و عکس برداری شدند.

شرایط بیوفیلیم بسیار بیشتر از حالت پلانکتونی است که یکی از دلایل اصلی این مقاومت، ماتریکس پلی ساکارییدی است که مانع از نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. در ضمن پایین بودن سطح فعالیت متابولیکی باکتری‌ها در بیوفیلیم نیز دلیل دیگری بر مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک هاست (۷). مطالعات بر روی شیگلا فلکسنری نشان داده که قرار گرفتن طولانی مدت این باکتری در معرض نمک‌های صفراوی منجر به تشکیل بیوفیلیم در آن می‌شود (۸). در ضمن غلظت نمک می‌تواند به‌طور قابل توجهی بر ظرفیت شیگلا در جهت تولید بیوفیلیم در چاهک‌های میکروپلیت اثرگذار باشد (۹). گزارش‌هایی نیز حاکی از آن بود که فرولیک اسید، تشکیل بیوفیلیم توسط شیگلا فلکسنری را محدود می‌کند (۱۰). این‌ها نشان دهنده تأثیر نمک‌ها و اسیدهای مختلف بر تشکیل بیوفیلیم این باکتری است.

از سوی دیگر در مورد سیستم‌های TA مطالعات اخیر نشان داده که در شرایط استرس، آنتی‌توکسین به‌طور انتخابی تخریب می‌شود و باعث فعال سازی توکسین و اجرای عملکردهای آن می‌شود (۱۱، ۱۲). پیشنهاد شده که توکسین‌های این سیستم‌ها با فرآیندهای سلولی مختلفی همچون تنظیم بیان ژن مرتبط هستند (۱۳). به علاوه مطالعات و شواهد متعددی نشان داده که این سیستم‌ها در تشکیل بیوفیلیم و کروم سنسینگ دخیل هستند (۱۴). Lon پروتئاز یک سرین پروتئاز حفاظت شده و وابسته به ATP در باکتری‌ها است که به‌طور انتخابی منجر به تخریب پروتئین‌های جهش یافته و غیر طبیعی و همچنین برخی پروتئین‌های تنظیمی با عمر کوتاه مانند آنتی‌توکسین‌ها می‌شود. بدین ترتیب با آزادسازی توکسین منجر به بروز فعالیت‌های آن می‌شود. این پروتئاز دارای نقش محوری در بسیاری از مکانیسم‌های باکتری‌ها از جمله تمایز سلولی، شرکت در تولید بیوفیلیم و بقای باکتری‌ها است (۱۶، ۱۷).

از آنجایی که اطلاعات چندانی در مورد وجود و شیوع این سیستم‌ها در باکتری شیگلا فلکسنری وجود نداشت و با توجه به بروز رسانی مرتب بانک‌های اطلاعاتی مرتبط با این سیستم‌ها، طی مطالعه ای پس از شناسایی ۴ سیستم TA توسط بانک‌های اطلاعاتی مذکور و همچنین طراحی توالی‌های اختصاصی مربوط به پرایمرها به کمک نرم افزارهای معتبر، میزان بیان ژن‌های مذکور را در کشت سلول و به دنبال عفونت سلول‌ها توسط باکتری شیگلا فلکسنری مورد ارزیابی قرار دادیم. لذا این مطالعه در راستای مطالعه قبلی که انجام گرفته بود، صورت گرفت (۱۸) و هدف ما

میکرولیتر گلاسیال استیک اسید ۳۳ درصد اضافه شد. بعد از تثبیت محتویات چاهک‌ها با اتانول و رنگ آمیزی با کریستال ویوله، جذب رنگ حل شده در اسید استیک توسط الیزاید در طول موج ۴۹۲ نانومتر مورد خوانش قرار گرفت. از محیط کشت به تنهایی به عنوان کنترل منفی (Negative control) استفاده شد. به این ترتیب برای بررسی کمی توانایی تولید بیوفیلیم در سویه شینگلا فلکسنری مورد مطالعه، میانگین جذب نوری سه چاهک محاسبه و با میانگین جذب نوری سه چاهک کنترل (محیط کشت نشده) مقایسه گردید و با مقایسه این اعداد توانایی تولید بیوفیلیم مشخص شد. توانایی تشکیل بیوفیلیم از طریق جدول ۱ به دست آمد. برای اطمینان از صحت انجام کار، این آزمایش و اندازه گیری‌ها با ۳ مرتبه تکرار و در زمان‌های مختلف صورت گرفت (۲۰).

ارزیابی کمی تشکیل بیوفیلیم با روش تست میکروتیتراپلیت
برای این منظور، باکتری شینگلا فلکسنری در محیط تریپتیکاز سوی براث (TSB) حاوی ۱ درصد گلوکز به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C کشت داده شد و سپس سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند تهیه شد. در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر از آن به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه تلقیح شد. چاهک‌های میکروپلیت پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷°C، ابتدا سه مرتبه توسط PBS شستشو داده شدند تا باکتری‌های معلق جدا شوند. در ادامه، باکتری‌های جدا نشده به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از اتانول ۹۵ درصد فیکس شدند و پلیت در هوا خشک شد. چاهک‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۰۲ درصد به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شدند. سپس میکروپلیت ۲ بار با آب مقطر شستشو داده شد تا رنگ اضافی از چاهک‌ها خارج شود. پس از خشک شدن، ۲۰۰

جدول ۱. محاسبه میزان توانایی تشکیل بیوفیلیم در مقایسه با کنترل

درجه تولید بیوفیلیم	شدت رنگ سنجی
عدم تولید	$OD < OD_{nc}$
ضعیف	$OD_{nc} < OD < 2 \times OD_{nc}$
متوسط	$2 \times OD_{nc} < OD < 4 \times OD_{nc}$
قوی	$4 \times OD_{nc} < OD$

میکرولیتر، پرایمرهای اختصاصی مستقیم و برگشتی با غلظت ۱۰ پیکومول از هر کدام ۰/۵ میکرولیتر و ۱۳ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. پس از اینکه ترکیبات لازم به مدت ۱۰ ثانیه اسپین شدند، داخل دستگاه ترمال سایکلر روتور جین (Corbett, Australia) قرار گرفتند. مراحل واکنش شامل یک مرحله فعال سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه بود و ۴۵ سیکل حرارتی شامل مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵°C به مدت ۱۵ ثانیه و مرحله اتصال و تکثیر در دمای ۶۰°C به مدت ۳۰ ثانیه. نتایج ریل تایم PCR با استفاده از نرم افزار Rest مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میزان بیان ژن‌ها (fold change) با استفاده از روش Livak محاسبه شد (۲۱، ۱۸).

تجزیه و تحلیل آماری

در مطالعه حاضر تمام اطلاعات بر اساس سه بار تکرار در هر آزمایش ارائه گردید و میانگین اندازه گیری‌ها در سه تکرار انجام شد و تحلیل آماری آن با آزمون آنالیز واریانس و با در نظر گرفتن $P < 0/01$ value به وسیله نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) تعیین گردید.

بررسی بیان ژن‌ها در شرایط بیوفیلیم با استفاده از qPCR

و روش لیواک

در زمان‌های ۸ و ۲۴ ساعت پس از القای تشکیل بیوفیلیم در سویه شینگلا فلکسنری، به کمک کیت استخراج RNA، (Roche, Germany)، RNA کل استخراج گردید و جهت سنجش غلظت و خلوص RNA میزان جذب نوری با استفاده از نانودراپ خوانده شد. پس از اطمینان خاطر از خلوص RNA استخراج شده، با استفاده از کیت سنتز cDNA (GeneAll Biotechnology, South Korea) به DNA تک رشته ای تبدیل شد. ژن 16S rRNA برای نرمال سازی داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه، بیان ژن‌های مورد مطالعه در حضور ژن کنترل داخلی نسبت به نمونه کنترل سنجیده شد. تمام آزمایش‌ها سه مرتبه انجام شد. در ضمن هر نمونه به صورت دو تایی در دستگاه قرار گرفت. برای هر ژن دو میکروتیوب بدون الگو جهت اطمینان از عدم وجود آلودگی قرار داده شد و تمام مراحل کار روی یخ انجام شد. برای تهیه مخلوط واکنش با حجم کل ۲۰ میکرولیتر، از سایبر گرین مستر میکس (qPCR) (Master Mix, Bioneer, Korea) به میزان ۵ میکرولیتر، cDNA ۱

یافته‌ها

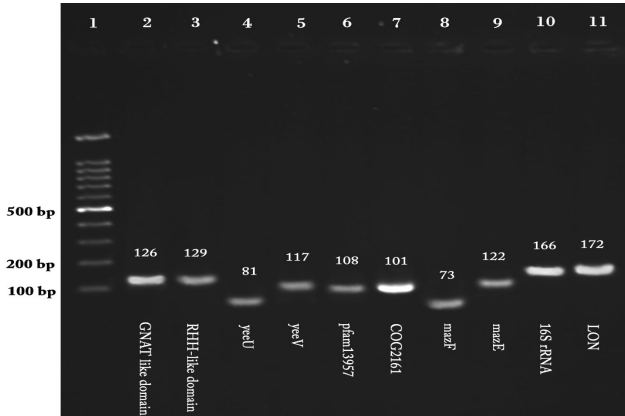
نسبت به کنترل بود. نتایج میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در ساعت‌های مذکور به ترتیب در شکل‌های ۲ و ۳ آورده شده است ($P < 0.01$).

نتیجهٔ آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز

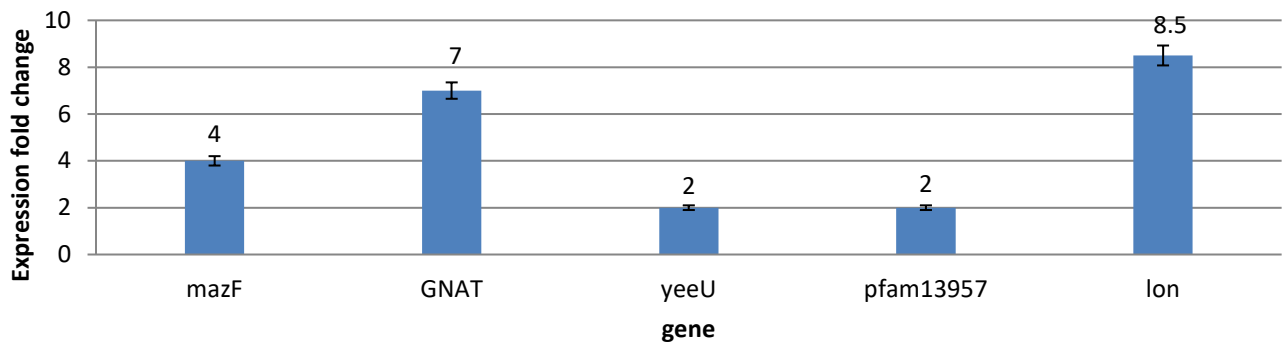
نتایج تکنیک PCR که در شکل ۱ آورده شده، تأیید کنندهٔ وجود ژن‌های سیستم‌های TA (از چپ به راست به ترتیب توکسین و سپس آنتی توکسین) و همچنین Lon پروتئاز در سویهٔ شیگلا فلکسنری مورد مطالعه بود.

نتایج تشکیل بیوفیلیم سویهٔ شیگلا فلکسنری و میزان بیان ژن‌ها

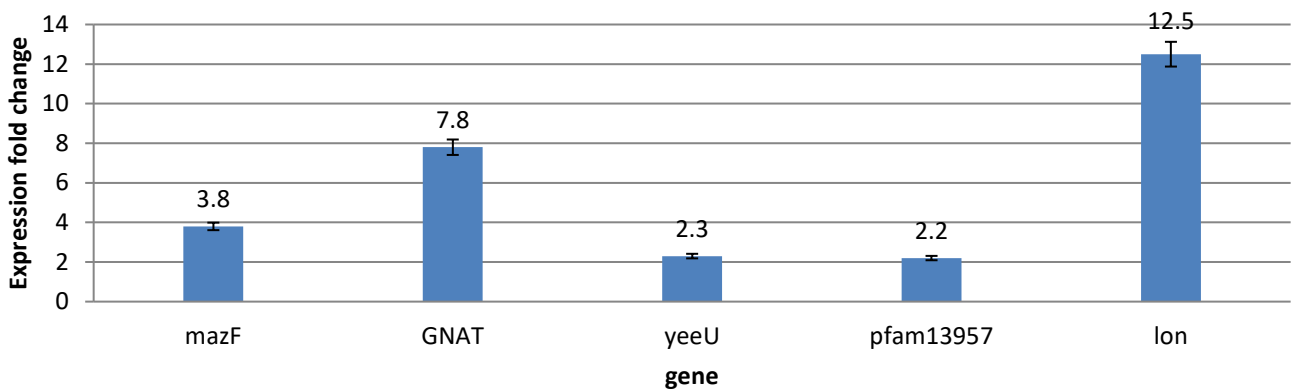
توانایی سویهٔ شیگلا فلکسنری مورد مطالعه در تولید بیوفیلیم به روش میکروتیتراپلیت و استفاده از الیزا ریدر مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که سویهٔ مورد آزمایش قادر به تولید بیوفیلیم به صورت قوی بوده است. در ادامه نتایج qPCR حاکی از افزایش بیان ژن‌های سیستم‌های TA و *lonP* در ساعت‌های ۸ و ۲۴ بعد از تشکیل بیوفیلیم



شکل ۱. ژل نتایج PCR ژن‌های مورد مطالعه در سویهٔ شیگلا فلکسنری



شکل ۲. نتایج بیان ژن‌های مورد مطالعه در شرایط بیوفیلیم نسبت به نمونه کنترل در ساعت ۸ (نتایج در حضور ژن کنترل داخلی 16S rRNA نرمال شده است) ($P < 0.01$).



شکل ۳. نتایج بیان ژن‌های مورد مطالعه در شرایط بیوفیلیم نسبت به نمونه کنترل در ساعت ۲۴ (نتایج در حضور ژن کنترل داخلی 16S rRNA نرمال شده است) ($P < 0.01$).

بحث

همچنین ارتباط میان این سیستم و افزایش رشد بیوفیلیم نشان داده شد (۲۷). نتایج متعددی در سایر باکتری‌ها نشان داده است که توکسین maz در شرایط سخت به بقای باکتری کمک می‌کند که این سیستم در سوپه مورد مطالعه ما نیز وجود داشت. در میکسوکوکوس زانتوس که یک باکتری گرم منفی است، MazF نقش مهمی داشته و با شروع تشکیل جسم تولید کننده اسپور، القا شده و منجر به مرگ ۸۰٪ جمعیت سلولی با لیز سلولی شده و ۲۰٪ سلول‌های باقی‌مانده، توانایی تشکیل اجسام تولید کننده اسپور را خواهند داشت (۲۸). Kwan و همکاران در مطالعه ای در سال ۲۰۱۵، با بررسی سیستم MqsR/MqsA تیپ II در *اشریشیا کلی* نشان دادند که با توجه به وجود غلظت بالای دئوکسیکولوات در کیسه صفرا و روده فوقانی، این سیستم برای رشد و بقای سلول‌های *اشریشیا کلی* در این بخش‌ها که غلظت بالایی از نمک صفرا دارند، از نظر فیزیولوژیکی مهم و حیاتی است (۲۹). هدف قرار دادن توکسین‌های مهم در این مطالعه و پروتئاز تنظیم کننده آن‌ها به‌عنوان روش مناسبی در جهت درمان پیشنهاد می‌شود. یکی از روش‌ها برای هدف قرار دادن یک ژن استفاده از تکنولوژی آنتی سنس است. Javanmard و همکاران در مطالعه ای در سال ۲۰۲۰ از طریق طراحی و به کار بردن آنتی‌سنس علیه ژن *cagA* در *هلیکوباکتر پیلوری* نشان دادند که آنتی‌سنس همراه با پپتید نفوذی می‌تواند به‌عنوان ابزاری موثر در مهار mRNA ژن هدف مورد استفاده قرار گیرد (۳۰).

نتیجه گیری

در پژوهش حاضر بیان ژن‌ها در شرایط بیوفیلیم نسبت به کنترل و عدم تشکیل بیوفیلیم مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که توکسین‌های GNAT و maz در شرایط بیوفیلیم در مقایسه با گروه کنترل افزایش بیان معنی داری داشتند. این نتایج نشان می‌دهد که این دو سیستم ممکن است که در ایجاد بیوفیلیم به باکتری کمک کنند. در ضمن با توجه به افزایش میزان بیان ژن *lon* پروتئاز، می‌توان به اهمیت و ضرورت آن در زنده ماندن باکتری از طریق تنظیم و کنترل سیستم‌های TA در شرایط بیوفیلیم پی برد. از این رو این پروتئین می‌تواند هدف مناسبی برای معرفی ترکیبات جدید درمانی باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله مراتب تشکر و سپاس خود را از تمام افرادی که در طی انجام این مطالعه همکاری موثر داشتند، اعلام می‌نمایم.

با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر و افزایش سطح بیان سیستم‌های TA در شرایط تشکیل بیوفیلیم، می‌توان به ارتباط میان سیستم‌های مذکور و تشکیل بیوفیلیم پی برد. Hemati و همکاران در سال ۲۰۱۴، با استفاده از روش PCR نشان دادند که در ایزوله‌های کلینیکی *سودوموناس آئروژینوزا* که توانایی بالایی در تشکیل بیوفیلیم دارند، ژن‌های سیستم‌های TA و کروم سنسینگ به فراوانی وجود دارند (۲۲) که نشان دهنده ارتباط بین تشکیل بیوفیلیم در باکتری با حضور سیستم‌های TA است و از این لحاظ با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد. در مطالعه ای، Wood و همکاران در سال ۲۰۱۶ موفق به شناسایی یک سیستم TA تیپ II به نام HigB/HigA در *سودوموناس آئروژینوزا* PA14 شدند و نشان دادند که توکسین HigB بر میزان تولید بیوفیلیم و فاکتورهای ویرولانس اثر گذاشته و به این ترتیب این سیستم بر بیماری‌زایی سوپه مذکور تأثیر می‌گذارد (۲۳). Valadbeigi و همکاران در سال ۲۰۱۷، اثر ترکیبی به نام PNA را بر بیان ژن آنتی‌توکسین mazE و تأثیر آن در تشکیل بیوفیلیم در ۱۸ ایزوله بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* بررسی کردند و بیان کردند که ژن آنتی‌توکسین mazE می‌تواند به‌عنوان هدفی برای کنترل تولید بیوفیلیم در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* مطرح باشد (۲۴). Chan و همکاران در مطالعه ای در سال ۲۰۱۸، چهار سیستم TA شامل *pezAT*، *yefM-yoeB*، *relBE* و *phD-doc* را در پاتوژن *استریپتوکوکوس پنومونیه* تشخیص داد و نشان دادند که سوپه‌های فاقد سیستم *yefM-yoeB* و همچنین موتانت‌هایی که هر دو سیستم *yefM-yoeB* و *relBE* را نداشتند، کاهش قابل توجهی در توانایی تشکیل بیوفیلیم از خود بروز دادند (۲۵) که این نشان می‌دهد که مشابه با نتایج مطالعه ما، بین حضور برخی از سیستم‌های TA و تشکیل بیوفیلیم رابطه مهمی وجود دارد. در مطالعه ای در سال ۲۰۱۹، Alhusseini و همکاران با بررسی ۵۴ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* MDR، حضور ۵ سیستم TA تیپ II شامل *hipBE*، *relBE*، *amazE*، *ccdAB* و *mqsR* و تشکیل بیوفیلیم را در آن‌ها مورد ارزیابی قرار دادند و بیان کردند که در ۹۰/۷۴٪ از ایزوله‌ها تشکیل بیوفیلیم مشاهده شده است و همچنین نتایج PCR در شناسایی جایگاه‌های ژن‌های سیستم‌های TA نشان داد که درصد بسیار بالایی از سیستم‌های مذکور در ایزوله‌های مورد مطالعه مشاهده گردید (۲۶) که نتایج آن با مطالعه حاضر مشابهت داشت. در مطالعه Ma و همکاران در سال ۲۰۱۹ که بر روی ۳ سوپه از *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام گرفت، نقش سیستم MazEF در عفونت‌ها و

منابع مالی

این مقاله پژوهشی مستقل است که بدون حمایت مالی سازمانی انجام گرفته است.

شایان ذکر است که این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه دکترای تخصصی آقای عرفان خردمند از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات بوده و هزینه‌های مالی این پژوهش بر عهده محققین بوده است.

تعارض در منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارضی در منافع را گزارش نکردند.