نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴

دوره ۷، شماره ۲، پائیز و زمستان ۱۴۰۳، صفحات ۱۱۷- ۱۲۸

بررسی اثر ارسولیک اسید بر مهار رشد و تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف جدا شده از گوشت مرغ

المیرا شمشادی[۱]، لیلا اسدپور[۲*]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی رشت، رشت، ایران.
۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی رشت، رشت، ایران.

دریافت مقاله: ۳۰ اردیبهشت ۱۴۰۳، بازنگری: ۲۱ آبان ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۱۰ آذر ۱۴۰۳

10.22034/nfvm.2025.458471.1239

چکیده

در سال‌های اخیر، مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از چالش‌های جدی در حوزه پزشکی است. باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به سرعت در حال گسترش هستند و درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها را دشوار کرده‌اند. هدف از مطالعه حاضر بررسی خواص ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی ارسولیک اسید در برابر سویه‌های *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف جدا شده از گوشت مرغ می‌باشد. اثر مهاری ارسولیک اسید بر جدایه‌های مورد مطالعه به روش انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت مهاری یا MIC به روش براث میکرودایلوشن و اثر ضد بیوفیلمی آن به روش میکروپلیت ارزیابی شد. همچنین تأثیر ارسولیک اسید بر زنده‌مانی *اشریشیاکلی* به روش سنجش Time Kill و اثر آن بر بیان ژن‌های بیوفیلم *fimH* و *csgA* به روش Real time-PCR بررسی شد. در این مطالعه، ارسولیک اسید اثر مهاری بر رشد همه جدایه‌ها نشان داد و MIC آن بین ۰/۴ تا ۱/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. درصد مهار بیوفیلم در شرایط تیمار شده با غلظت‌های زیر مهاری ارسولیک اسید در ۶ جدایه مورد مطالعه بین ۵۱/۲ تا ۶۷/۳ درصد متغیر بود همچنین در مطالعه حاضر تیمار با غلظت تحت مهاری ارسولیک اسید سبب کاهش بیان ژن‌های *fimH* و *csgA* گردید. نتایج این مطالعه بیانگر اثر مهاری ارسولیک اسید بر رشد جدایه‌های *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز و کاهش قدرت تشکیل بیوفیلم آن است. انجام مطالعات درون تنی می‌تواند امکان کاربرد بالینی آن در کنترل عفونت ناشی از جدایه‌های مقاوم به دارو را روشن سازد.

واژگان کلیدی: *اشریشیاکلی، ارسولیک اسید، ضد بیوفیلمی، بتالاکتاماز*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: l.asadpour@yahoo.com

مقدمه

با وجود پیشرفت‌های گسترده در علوم و صنایع غذایی، بیماری‌های منتقله از غذا همچنان یکی از جدی‌ترین تهدیدات بهداشت عمومی در سراسر جهان به‌شمار می‌رود، که هر ساله صدها میلیون نفر را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این مشکل در کشورهای در حال توسعه و در میان افرادی که به ضعف سیستم ایمنی و یا سوء تغذیه مبتلا هستند، در حال افزایش است. ظهور پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، به‌ویژه در بیماری‌های منتقله از غذا، چالشی جدی برای سلامت عمومی ایجاد کرده است (۱). *اشریشیاکلی* باسیل گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و فاقد اسپور است که در خانواده انتروباکتریاسه قرار دارد. *اشریشیاکلی* طیف مختلفی از عفونت‌ها مثل مسمومیت غذایی، اسهال در بالغین، اسهال کشنده در کودکان، عفونت ادراری، سیستیت، پیلونفریت، ابسه‌های شکمی، پنومونی، استئومیلیت، عفونت بافت نرم و باکتریومی ایجاد می‌کند. *اشریشیاکلی* یکی از پاتوژن‌های رایج در بیماری‌های منتقله از غذا می‌باشد و توانایی بالای آن در فساد گوشت مرغ که از مهم‌ترین منابع پروتئینی مورد مصرف در ایران است، در مطالعات مختلف گزارش شده است (۲، ۳). امروزه مسئله مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین باکتری‌های پاتوژن به یک معضل بزرگ در امر درمان تبدیل شده است. در طول ۵ دهه گذشته افزایش مقاومت در *اشریشیاکلی* نیز دیده شده است. عمده‌ترین روش مقابله این باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های کلاس بتالاکتام، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز توسط باکتری‌ها می‌باشد که به دو صورت کروموزومی (بسیاری از باکتری‌های گرم منفی) و پلاسمیدی (*استافیلوکوکوس اورئوس*) تولید می‌شوند. با توجه به اهمیت باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتاماز لازم است تدابیر درستی برای درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط این ارگانیسم‌های مقاوم اتخاذ شود. یکی از گزینه‌های مورد توجه در سال‌های اخیر دستیابی به ترکیبات مهارکننده آنزیم بتالاکتاماز است (۴).

در این راستا، تحقیقات گسترده‌ای برای کشف ترکیبات طبیعی با خاصیت ضد باکتریایی انجام شده است. محصولات طبیعی مشتق شده از ضایعات فراوری میوه به‌عنوان منبع متابولیت‌های ضد باکتریایی جدید شناخته شده‌اند. یکی از این ترکیبات، اسید ارسولیک، یک متابولیت ثانویه است که به‌دلیل اثرات ضد باکتریایی، ضد التهابی و ضد سرطانی خود، به‌طور فزاینده‌ای مورد توجه قرار گرفته است. ارسولیک اسید بر مسیرهای پیام‌رسانی سلولی، القای آپوپتوز و کاهش رشد تومور مؤثر بوده به‌عنوان یک ترکیب امیدوارکننده برای پیشگیری و درمان سرطان در نظر گرفته می‌شود (۵). اخیراً فعالیت ضد میکروبی ارسولیک اسید در برابر باکتری‌های مختلف از جمله *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیاکلی*، *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا فلکسنری*، *ویبریو کلرا*، *انتروکوکوس فیکالیس* و *لیستریا مونوسیتوز*، نشان داده شده است (۶). ارسولیک اسید می‌تواند به‌طور هم‌افزایی با آنتی‌بیوتیک‌ها برای افزایش فعالیت آنها استفاده شود و کارآمدی آن در پراکندگی بیوفیلم تولید شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* اثبات گردیده است (۵). با توجه به خواص بیولوژیک ارسولیک اسید هدف این مطالعه، ارزیابی اثرات مهاری آن بر رشد و بیان ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم در سویه‌های *اشریشیاکلی* تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه، جداسازی و شناسایی باکتری

اشریشیاکلی: در سال ۱۴۰۲ تعداد ۹۰ نمونه گوشت مرغ از مراکز فروش در استان گیلان جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده بر روی محیط‌های کشت آگار مک‌کانکی و آگار EMB کشت داده شدند. سپس کلونی‌های لاکتوز مثبت رشد کرده با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی شامل بررسی تولید اندول، واکنش متیل رد، واکنش وژ پروسکوئر، تولید اوره آز، مصرف سیترات، تخمیر گلوکز و دکربوکسیلایون ارنیتین و لیزین تعیین هویت گردیدند (۲).

شناسایی مولکولی جدایه‌های اشرشیاکلی

استخراج DNA: استخراج DNA جدایه‌ها با استفاده از روش جوشاندن انجام شد. به این ترتیب که یک کلنی از محیط برداشته و در محیط BHI براث درون میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری حل و به‌مدت ۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. بعد میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس مایع رویی دور ریخته شد و رسوب در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر به حالت سوسپانسیون درآمد. برای لیز سلول‌ها سوسپانسیون حاصل به‌مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد، پس از آن محلول در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی حاوی DNA استخراج شده در نظر گرفته شد (۷).

بررسی حضور ژن uspA در واکنش PCR: جهت شناسایی مولکولی و تأیید تشخیص *اشریشیاکلی* از واکنش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن پروتئین USP استفاده شد. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است (۸). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس PCR (سیناژن، ایران)، پرایمرهای پیشرو و پیرو (۲۰ پیکومول) اختصاصی ژن *uspA*، ۱ میکرولیتر، DNA الگو ۳ میکرولیتر، آب مقطر ۷/۵ میکرولیتر انجام گرفت. برنامه حرارتی ترموسایکلر به‌ترتیب شامل مراحل واسرشته شدن اولیه در ۹۴ درجه به‌مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل حرارتی ۹۴ درجه ۱ دقیقه، ۵۹ درجه ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۴۵ ثانیه بود. سپس یک مرحله ده دقیقه‌ای طویل شدن نهایی اضافه گردید. از باکتری *اشریشیاکلی* ATCC 25922 به‌عنوان کنترل استفاده گردید.

الکتروفورز محصول PCR: برای تأیید صحت انجام PCR و اطمینان از طول درست قطعه تکثیر شده، محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی DNA safe stain (سیناژن، ایران) الکتروفورز گردید. برای این کار، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR همراه با ۲ میکرولیتر از بافر بارگزاری مخلوط و درون چاهک‌های ژل بارگزاری شدند. در چاهک اول مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA و در چاهک‌های بعدی نمونه‌ها ریخته شد. الکتروفورز با ولتاژ ۱۲۰ ولت به‌مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. پس از اتمام الکتروفورز، ژل بر روی صفحه دستگاه ترانس ایلومیناتور مجهز به دوربین تحت اشعهUV قرار داده شد و تصویربرداری گردید.

تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های اشریشیاکلی: تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* توسط تست آنتی‌بیوگرام (دیسک دیفیوژن) و مطابق استاندارد CLSI انجام شد (۹). برای این منظور ابتدا محیط کشت مولر هینتون آگار آماده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با کدروت ۰/۵ مک فارلند به‌صورت چمنی و پر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. بعد از کشت دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد استفاده شامل جنتامایسین، اریترومایسین، سفتازیدیم، سفوتاکسیم، تتراسیکلین، کوتریموکسازول و سیپروفلوکساسین تحت شرایط استریل با استفاده از پنس استریل به کشت منتقل شد. بعد از قرار دادن دیسک‌ها در پلیت بسته و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماخانه‌گذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت پلیت بررسی و با استفاده از خط‌کش قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری گردید. بررسی فنوتیپی تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در جدایه‌های مورد مطالعه به روش دیسک ترکیبی و طبق دستور عمل CLSI انجام شد. بدین منظور در تست آنتی‌بیوگرام از دیسک‌های سفتازیدیم و سفتازیدیم + کلاولانیک اسید استفاده شد. در صورتی که تفاوت قطر هاله عدم رشد در دیسک تنها و دیسک حاوی مهارکننده کلاولانیک اسید بزرگ‌تر / مساوی ۵ میلی‌متر بود، سویه مورد مطالعه مولد آنزیم در نظر گرفته شد (۹).

ارزیابی فنوتیپی قابلیت تولید بیوفیلم جدایه‌ها به روش میکروپلیت: برای بررسی قدرت تشکیل بیوفیلم

ابتدا از جدایه‌های مورد مطالعه در محیط تریپتیکاز سوی براث (مرک، آلمان) حاوی ۱ درصد گلوکز سوسپانسیونی معادل نیم مک‌فارلند تهیه شد. سپس به هر چاهک الیزا ۲۰۰ میکرولیتر از این کشت اضافه شد و میکروپلیت در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از انکوبه شدن، چاهک‌ها سه بار با PBS شستشو شدند تا باکتری‌هایی که نچسبیده‌اند جدا شوند. در مرحله بعد، سایر باکتری‌هایی که به چاهک چسبیده‌اند با استفاده از ۲۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه فیکس شدند. بعد از آن هر چاهک با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۲درصد رنگ‌آمیزی شد و بعد از ۵ دقیقه رنگ با آب مقطر شستشو داده شد.

بعد از خشک شدن پلیت‌ها، آنالیز کمّی بیوفیلم با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر از گلاسیال استیک اسید ۳۳ درصد به هر چاهک و خواندن جذب نوری آنها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر محاسبه شد. در ارزیابی بیوفیلم تشکیل شده بر اساس میزان جذب نوری، سویه‌ها به‌عنوان تولیدکننده قوی بیوفیلم (OD > 1.500)، تولیدکننده بیوفیلم (1.500> OD > 0.500) و بیوفیلم منفی (OD<0.500) در نظر گرفته شدند (۱۰).

بررسی اثر مهاری ارسولیک اسید بر جدایه‌های بالینی اشریشیاکلی به روش انتشار از دیسک: به‌منظور بررسی اثر ضد میکروبی ارسولیک اسید بر جدایه‌های *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، از روش انتشار از دیسک استفاده شد. برای این منظور ابتدا محیط کشت مولر هینتون آگار آماده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با کدروت ۰/۵ مک‌فارلند به‌صورت چمنی و پر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. بعد از کشت دیسک‌های آغشته به ۰/۱ میلی‌گرم میلی‌گرم ارسولیک اسید تحت شرایط استریل با استفاده از پنس استریل به کشت منتقل شد. بعد از قرار دادن دیسک‌ها در پلیت بسته و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماخانه‌گذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت پلیت بررسی و با استفاده از خط‌کش قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری گردید. این آزمایش در ۳ تکرار انجام شد.

تعیین MIC ارسولیک اسید به روش براث میکرودایلوشن: جهت بررسی کمترین غلظت مهارکننده رشد ارسولیک اسید بر جدایه‌های *اشریشیاکلی*، در میکروپلیت ۹۶ خانه سری رقت‌های متوالی از ارسولیک اسید در محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد. سپس از جدایه‌های *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف کشت تازه با کدورتی معادل با استاندارد نیم مک‌فارلند تهیه شد. سپس از سوسپانسیون میکروبی حاصل، ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. این آزمایش در ۲ تکرار انجام شد (۱۱).

بررسی اثربخشی ارسولیک اسید در برابر جدایه اشریشیاکلی با استفاده از روش محاسبه زمان کشتار (Time kill assay): اثربخشی ارسولیک اسید در برابر جدایه *اشریشیاکلی* با استفاده از روش محاسبه زمان کشتار در فواصل زمانی مختلف در یک دوره ۲۴ ساعته تعیین شد. در این سنجش، سوسپانسیون باکتریایی ۵×۱۰^{۵} CFU/mL در لوله‌های حاوی ۲ میلی‌لیتر مولر هینتون براث همراه با غلظت‌های 2MIC، MIC، 1/2MIC از ارسولیک اسید کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در فواصل زمانی (۰، ۲، ۴، ۸ و ۲۴ ساعت) انکوباسیون، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت هر چاهک برداشته شد و به‌صورت متوالی (۱۰:۱) با PBS رقیق شد و برای تعیین زنده ماندن باکتری‌ها در پلیت‌های مولر هینتون آگار کشت داده شد (۱۲). آزمایش زمان کشتار در دو تکرار مستقل انجام شد تا نتایج به‌دست آمده از اعتبار بیشتری برخوردار باشد.

بررسی اثر ارسولیک اسید بر مهار بیوفیلم اشریشیاکلی: اثرات کمی ضد بیوفیلمی به روش میکروپلیت ۹۶ خانه بررسی شد. روش کار همانند ارزیابی فنوتیپی قابلیت تولید بیوفیلم بود با این تفاوت که محیط

تریپتیکاز سوی براث حاوی غلظت تحت MIC ارسولیک اسید بود. چاهک‌های حاوی محیط به تنهایی و ارسولیک اسید به تنهایی عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. سنجش کمی بیوفیلم پس از انکوباسیون به‌صورت درصد تعیین شد. میزان جذب نوری چاهک‌های فاقد ارسولیک اسید به‌عنوان ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد (۱۳). این آزمایش در ۲ تکرار انجام شد.

بررسی اثر ارسولیک اسید بر بیان ژن‌های *fimH* و *csgA*

استخراج RNA و سنتز cDNA : از جدایه‌های *اشریشیاکلی* تیمار شده با غلظت تحت MIC ارسولیک اسید که حضور ژن‌های *fimH* و *csgA* در آنها با واکنش PCR تأیید شده بود، استخراج RNA با استفاده از کیت شرکت سیناژن (سیناژن، ایران) انجام گردید. همچنین از کشت باکتری بدون حضور مواد ضد میکروبی به‌عنوان کنترل استفاده شد. بلافاصله از RNA استخراج شده برای ساخت cDNA با استفاده از کیت RT شرکت سیناژن استفاده شد. بدین ترتیب که ۱ میکروگرم از RNA استخراج شده همراه با ۱ میکرولیتر پرایمر رندوم هگزامر با اضافه کردن آب DEPC treated در میکروتیوب عاری از نوکلئاز به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و پس از آن ۲ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. سپس مخلوط به آرامی spin شد و ۱۰ میکرولیتر cDNA synthesis mix به آن اضافه شد. پس از مخلوط کردن اجزای واکنش، میکروتیوب به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ و سپس ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت با قرار دادن میکروتیوب در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، واکنش متوقف گردید. صحت انجام واکنش سنتز cDNA از طریق انجام الکتروفورز روی ژل آگارز تأیید گردید.

انجام واکنش Real time-PCR : در این مرحله cDNA سنتز شده به‌عنوان الگو در واکنش Real time-PCR مورد استفاده قرار گرفت. در این واکنش از ژن *gapA* به‌عنوان ژن استاندارد استفاده شد. پرایمر اختصاصی ژن‌های مورد بررسی به‌صورت لیوفیلیزه از شرکت متابیون (آلمان) تهیه گردید. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت شرکت Genet bio CAT.NO:Q۹۲۱۰ کره جنوبی به‌صورت زیر انجام شد:

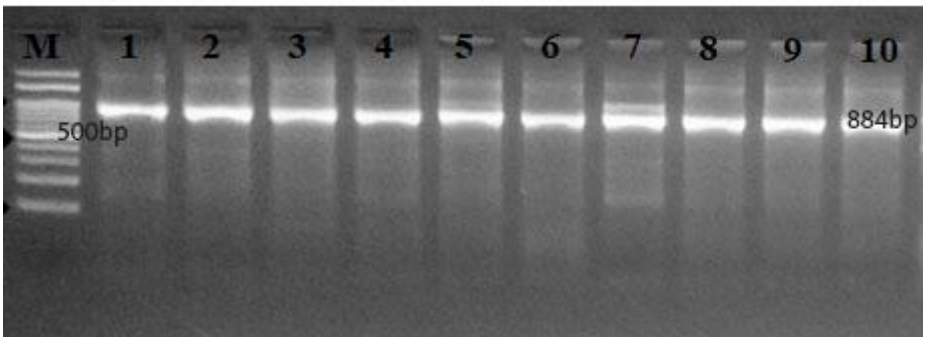
۱۰ میکرولیتر از mix (2x) with syber green qmaster ، پرایمرهای پیشرو و پیرو (۱۰ میکرومول) ۱ میکرولیتر، cDNA الگو (۱ میکروگرم) ۱ میکرولیتر، آب مقطر ۷ میکرولیتر انجام گرفت. برنامه حرارتی ترموسایکلر به‌ترتیب شامل مراحل واسرشته شدن اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه، ۳۵سیکل حرارتی ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه بود. تغییر بیان ژن از طریق $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. این آزمایش در ۳ تکرار انجام شد.

جدول ۱- نام و توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR و Real time PCR

کاربرد	منبع	توالی نوکلئوتیدی (´۵ به ´۳)	نام ژن
PCR	۷	CCGATACGCTGCCAATCAGT ACGCAGACCGTAGGCCAGAT	*usp*A-F *usp*A-R
Real time-PCR	۱٤	GCAGAGGTGTCATTATATCCC CGTTCAGTTAGGACAGGTTC	*fim*H-F *fim*H-R
Real time-PCR		CCCGTATACGAGTTGTCAGA GCTCAATCGATCTGACCCAA	*csg*A-F *csg*A-R
Real time-PCR	۱۵	ACTTACGAGCAGATCAAAGC AGTTTCACGAAGTTGTCGTT	*gap*A-F *gap*A-R

نتایج

باکتری مورد مطالعه: از تعداد ۹۰ نمونه مورد بررسی، ۵۲ جدایه باسیل گرم منفی ،کاتالاز منفی، اکسیداز منفی که در محیط TSI به‌صورت اسید- اسید ،H2S منفی و گاز مثبت بود، تست حرکت آن مثبت ،ایندول مثبت ،MR مثبت، VP منفی و همچنین سیمون سیترات آن منفی بود به‌عنوان *اشریشیاکلی* در نظر گرفته شدند و در واکنش PCR تشخیص باکتری تأیید شد. الکتروفورز محصول PCR ژن *uspA* در شکل ۱ آمده است.



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن *uspA* در جدایه‌های اشریشیاکلی. ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱: محصول ۸۸۴ جفت بازی ژن *uspA* در باکتری اشریشیاکلی ATCC 25922 ، ستون‌های ۱۰-۲: محصول ۸۸۴ جفت بازی ژن *uspA* در جدایه‌های مورد مطالعه

تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها: در بررسی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیاکلی* بیشترین میزان مقاومت جدایه‌ها نسبت به تتراسیکلین (۷۸/۸۴ درصد) و کوترموکسازول (۷۶/۹۲ درصد) بود. مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه شامل اریترومایسین ۶۳/۴۶ درصد، سیپروفلوکساسین ۴۴/۲۳ درصد، سفتازیدیم ۱۳/۴۶ درصد، و سفوتاکسیم ۱۱/۵۴درصد بود و جنتامایسین مؤثرترین (۹۶/۱۵ درصد حساسیت) آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه بود (جدول ۲). در این بررسی ۲۲ جدایه (۴۲/۳۱درصد) دارای مقاومت چندگانه دارویی و ۶ جدایه (۱۱/۵۴ درصد) مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف بودند.

جدول ۲. تست آنتی بیوگرام جدایه های اشرشیا کلی مورد مطالعه

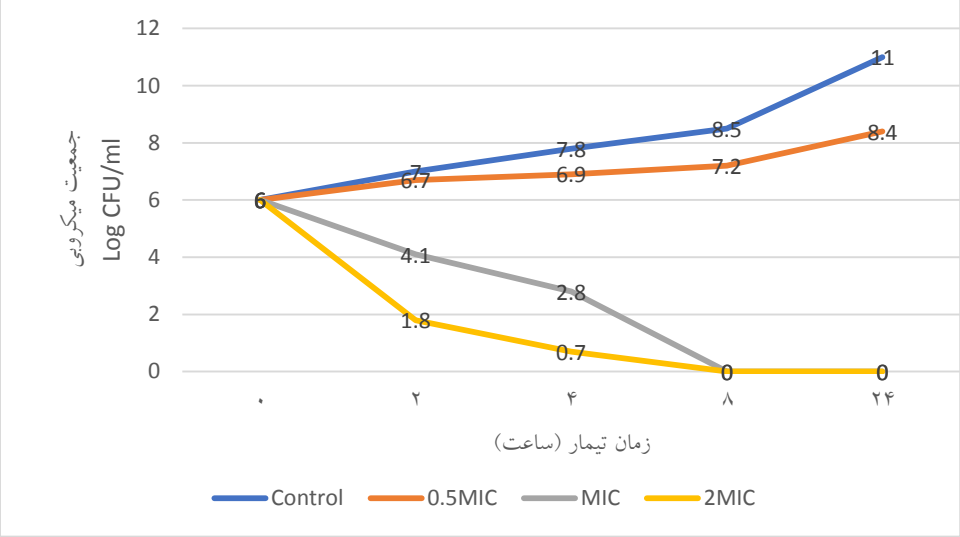
آنتی‌بیوتیک	تعداد (درصد) مقاومت
جنتامایسین	۲(۳/۸۵)
سفوتاکسیم	۶(۱۱/۵۴)
سفتازیدیم	۷(۱۳/۴۶)
سیپروفلوکساسین	۲۳(۴۴/۲۳)
اریترومایسین	۳۳(۶۳/۴۶)
کوتریموکسازول	۴۰(۷۶/۹۲)
تتراسیکلین	۴۱ (۷۸/۸۴)
مقاومت چندگانه	۲۲ (۴۲/۳۱)

بررسی قابلیت تولید بیوفیلم در جدایه‌ها: در بررسی فنوتیپی قابلیت تولید بیوفیلم در جدایه‌ها، ۳۸ جدایه (۷۳/۱ درصد) قادر به تولید بیوفیلم بودند که از این تعداد ۲۳ جدایه (۴۴/۲۳ درصد) تولیدکننده بیوفیلم قوی بودند. ۶ جدایه با قابلیت تولید بیوفیلم قوی و مولد ESBL، برای ادامه مطالعه انتخاب شد.

اثر مهاری ارسولیک اسید بر جدایه‌های اشریشیاکلی: اثر ارسولیک اسید بر مهار رشد جدایه‌های

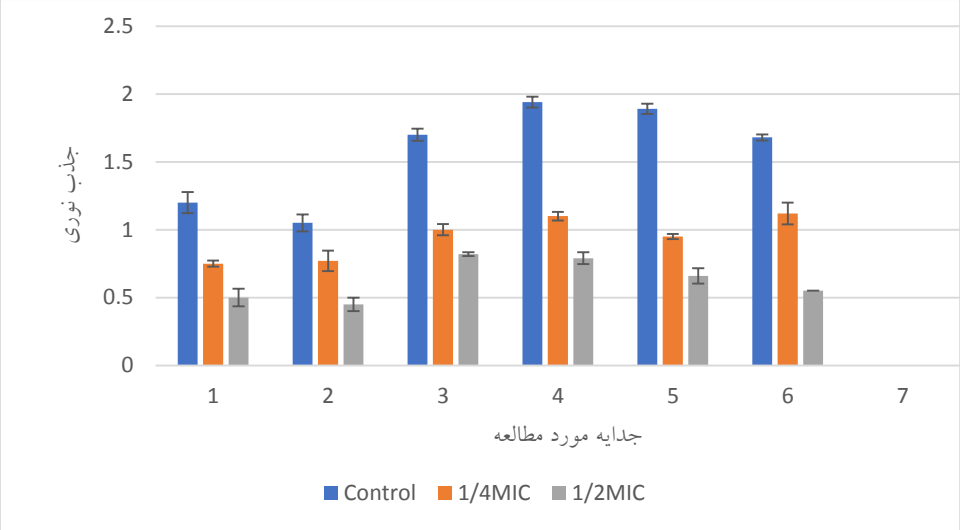
اشریشیاکلی به روش انتشار از دیسک و تعیین MIC بررسی شد. قطر هاله ممانعت از رشد ایجاد شده توسط ۰/۱ میلی‌گرم ارسولیک اسید در جدایه‌های مورد بررسی بین ۷ تا ۱۵ میلی‌متر متغیر بود. کمترین غلظت مهارکننده رشد (MIC) ارسولیک اسید در جدایه‌های مولد بتالاکتاماز به روش براث میکرودایلوشن بررسی شد. این مقدار در جدایه‌های مورد بررسی بین ۰/۴ تا ۱/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متغیر بود.

اثر ارسولیک اسید بر زمان کشتار اشریشیاکلی: فعالیت باکتری‌کشی الاژیک اسید در برابر جدایه منتخب *اشریشیاکلی* بر حسب تغییرات در $\log_{10}$ CFU/ml سلول‌های زنده در نمودار ۱ نشان داده شده است. در نمودار سنجش زمان کشتار، $\log_{10}$CFU/mL پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در نمونه شاهد به ۱۱ رسید. در تیمار باکتری با غلظت 1/2MIC الاژیک اسید کاهش تدریجی تعداد باکتری‌ها در زمان‌های بین ۰ تا ۲۴ ساعت مشاهده شد و الاژیک اسید باعث کاهش ۲/۶ واحدی در $\log_{10}$ CFU/ml پس از ۲۴ ساعت مواجهه شد. در تیمار با غلظت MIC و 2MIC الاژیک اسید تعداد سلول‌های *سودوموناس آئروژینوزا* زنده به شدت کاهش یافت و هیچ سلول زنده پس از ۸ ساعت در جدایه‌های آزمایش شده مشاهده نشد. همچنین مشاهده شد که کاهش جمعیت باکتریایی ایجاد شده توسط الاژیک اسید به غلظت الاژیک اسید و زمان قرار گرفتن در معرض آن بستگی دارد.



نمودار ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف ارسولیک اسید بر زنده‌مانی *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز

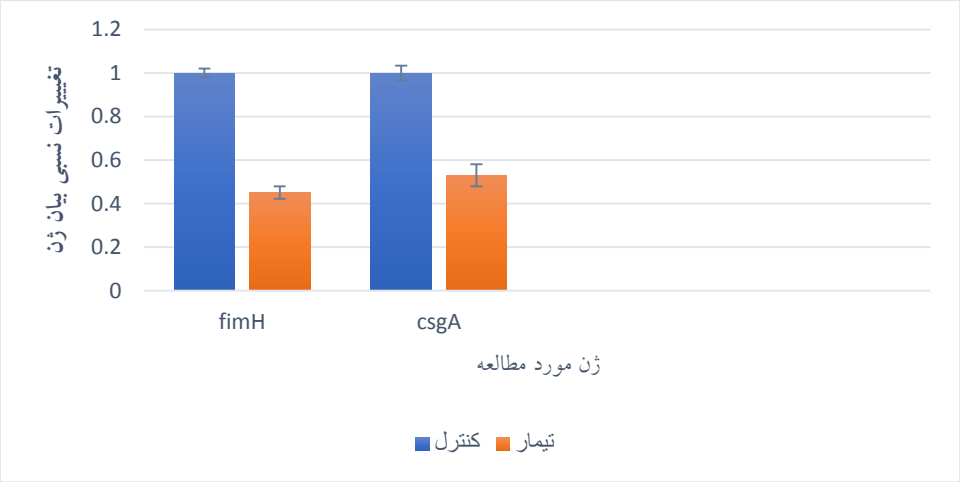
اثر مهاری ارسولیک اسید بر تشکیل بیوفیلم جدایه‌های بالینی اشریشیاکلی: ارسولیک اسید در غلظت‌های 1/2MIC و 1/4MIC قادر به کاهش قدرت اتصال *اشریشیاکلی*‌های مورد مطالعه گردید. درصد مهار بیوفیلم در شرایط تیمار شده با غلظت تحت MIC ارسولیک اسید در ۶ جدایه مورد مطالعه بین ۵۱/۲ تا ۶۷/۳ درصد متغیر بود (نمودار ۲).



نمودار ۲-جذب نوری جدایه‌های *اشریشیاکلی* تحت تیمار با غلظت‌های1/2MIC و 1/4MIC در مقایسه با شاهد

اثر ارسولیک اسید بر بیان ژن‌های *fimH* و *csgA*

: بررسی بیان ژن‌های *fimH* و *csgA* ، در باکتری *اشریشیاکلی* تحت تیمار با غلظت SubMIC ارسولیک اسید نشان داد که تفاوت بین تیمار و کنترل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است و ارسولیک اسید به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد موجب کاهش بیان ژن فوق شده است (نمودار۳). آنالیز آماری با t-test و نرم‌افزار SPSS انجام شده است.



نمودار ۳- تغییرات بیان ژن‌های *fimH* و *csgA* در نمونه شاهد و تحت تیمار با ارسولیک اسید

بحث و نتیجه‌گیری

مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی بین باکتری‌ها یک مشکل جهانی است و علاوه بر شکست درمان، موجب گسترش مقاومت بین سایر باکتری‌ها و پدید آمدن سویه‌های مقاوم‌تر می‌شود. اعضای خانواده انتروباکتریاسه شامل مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای انسانی می‌باشند. اعضای این خانواده به‌طور معمول نسبت آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند و این مقاومت ناشی از مکانیسم‌های متعدد ذاتی اکتسابی است در حال حاضر، کاهش حساسیت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها در جدایه‌های *اشریشیاکلی* مشاهده

می‌شود. چالش پزشکی امروز جستجوی روش‌های جایگزین در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است (۲). انواع زیادی از مولکول‌ها با پتانسیل فعالیت ضد میکروبی از متابولیسم ثانویه گیاهان تولید می‌شوند. اکثر این مولکول‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی ضعیف‌تری در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های تولیدی از باکتری‌ها یا قارچ‌ها هستند. با این حال، این ترکیبات می‌توانند به‌صورت هم‌افزایی با داروهای ضد میکروبی برای تقویت اثر آنها عمل کنند و به میزبان کمک کنند تا بر عفونت غلبه کند. ترکیبات گیاهی از جمله، پنتا سیکلیک تری‌ترپن‌ها به‌دلیل فعالیت‌های دارویی متعدد همراه با سمیت کم برای سلول‌های یوکاریوتی به شدت مورد توجه هستند (۱۶،۱۷).

در این مطالعه از ۹۰ نمونه گوشت مرغ، در ۵۲ مورد باکتری *اشریشیاکلای* شناسایی شد که ۷۳/۱ درصد این جدایه‌ها مولد بیوفیلم، ۴۲/۳۱درصد دارای مقاومت چندگانه دارویی و ۱۱/۵۴ درصد مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف بودند. از باکتری‌های جداسازی شده تعداد ۶ جدایه با قدرت تولید بیوفیلم قوی و مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف انتخاب گردید و اثر ارسولیک اسید بر مهار رشد و تشکیل بیوفیلم آنها بررسی شد. در این مطالعه ارسولیک اسید اثر مهاری بر رشد همه جدایه‌ها نشان داد و MIC آن در ۶ جدایه مورد مطالعه بین ۰/۴ تا ۱/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در نتایج به‌دست آمده توسط Wojnicz و همکاران، مقادیر MIC ارسولیک اسید برای سویه‌های مختلف *انتروکوکوس فیکالیس* بین ۳۲ تا ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۱۸). در مطالعه Fontanay و همکاران مقادیر MIC ارسولیک اسید در برابر سویه‌های بالینی *انتروکوکوس فیکالیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بزرگتر/ مساوی ۲۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (۱۹). نتایج Horiuchi و همکاران نشان داد که MIC ارسولیک اسید در برابر باکتری‌های گرم منفی بالاتر از MIC آن در سویه‌های گرم مثبت است (۲۰). این تفاوت در مقادیر MIC می‌تواند ناشی از تفاوت در روش‌های مورد استفاده برای تعیین مقدار MIC، گونه‌های مختلف باکتری‌های آزمایش شده و تفاوت در منشأ این میکروارگانیسم‌ها باشد. باکتری‌های گرم منفی دارای غشای خارجی با لیپوپلی ساکارید در برگچه بیرونی و فسفولیپیدها در برگچه داخلی هستند. این ساختار خاص یک مانع مؤثر در برابر نفوذ ترکیبات ضد میکروبی در گرم منفی است. از آنجایی که اسانس‌های گیاهی و اجزای آنها ماهیتی آبگریز دارند، غشای پلاسمایی حاوی لیپید باکتری را هدف قرار می‌دهند و غشا را نفوذپذیرتر می‌کنند (۲۱). در مطالعه‌ای Broniatowski و همکاران دریافتند که تری‌ترپن‌های پنج حلقه‌ای از جمله ارسولیک اسید با فسفولیپیدهای غشاهای باکتریایی تعامل کرده و موجب تخریب غشا، از بین رفتن پایداری سلول و مرگ باکتری می‌شوند (۲۲). این یافته می‌تواند اثر مهاری ارسولیک اسید بر جدایه‌های مورد مطالعه را توجیه کند در بررسی اثر ارسولیک اسید بر کشتار جدایه‌های مورد مطالعه، اثر مهاری آن بر رشد جدایه‌ها، پس از ۲، ۴، ۸ و ۲۴ ساعت مشاهده شد. بیشترین کاهش تعداد باکتری‌ها پس از ۸ ساعت مشاهده شده و پس از ۲۴ ساعت این کاهش به‌طور قابل توجهی بیشتر شده است. در مطالعه مشابهی Kim و همکاران نیز نشان دادند که ارسولیک اسید رشد فرم پلانکتونی *استرپتوکوکوس سابرینوس* را مهار کرده و در غلظت 1/2MIC به‌طور مؤثری بقا باکتری را کاهش می‌دهد (۲۳).

در مطالعه حاضر ارسولیک اسید در غلظت 1/2MIC توانست تشکیل بیوفیلم جدایه‌های *اشریشیاکلی* را بین ۵۱/۲ تا ۶۷/۳ درصد مهار کند. در مطالعه Potera و همکاران هم مشخص شد ارسولیک اسید در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قادر است تشکیل بیوفیلم در *E. coli* K-12 و *P. aeruginosa* PAO1 را به‌ترتیب ۷۹ و ۸۷ درصد مهار کند (۲۴). این تفاوت در مقادیر مهار ممکن است به‌علت تفاوت در غلظت ارسولیک اسید و شرایط آزمایشی بین دو مطالعه باشد. همچنین مشخص شده است که ارسولیک اسید قادر به مهار تشکیل بیوفیلم

استافیلوکوکوس اورئوس و پراکندگی بیوفیلم تولید شده توسط این باکتری است (۲۵، ۲۶). رشد باکتری‌های پاتوژن در بیوفیلم‌ها تهدید جدی برای سلامت انسان است. چون در بیوفیلم، باکتری از دسترس سیستم ایمنی و آنتی‌بیوتیک‌ها مصون می‌ماند. با توجه به اینکه بیوفیلم‌ها عوامل بیماری‌زایی مهم در باکتری‌ها هستند مهار بیوفیلم توسط ارسولیک اسید اهمیت بسزایی دارد. در مطالعه حاضر ارسولیک اسید موجب کاهش بیان ژن‌های *fim*H و *csg*A شد که هر دو نقش مهمی در تشکیل بیوفیلم دارند. در مطالعه دیگری تأثیر معنی‌دار ارسولیک اسید بر کاهش بیان ژن‌های مؤثر در بیوفیلم *کلبسیلا پنومونیه* گزارش گردید (۶). این یافته‌ها نشان می‌دهند که کاهش بیان ژن‌های مؤثر در تشکیل بیوفیلم می‌تواند یکی از مکانیسم‌های مؤثر در خاصیت ضد بیوفیلمی ارسولیک اسید باشد.

نتایج این مطالعه بیانگر اثر مهاری ارسولیک اسید بر رشد جدایه‌های *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز و کاهش قدرت تشکیل بیوفیلم آنهاست. انجام مطالعات درون‌تن می‌تواند امکان کاربرد آن در کنترل رشد و عفونت ناشی از جدایه‌های مقاوم به داروی این باکتری را روشن سازد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول در دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت است. نویسندگان مقاله از حمایت حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت کمال تشکر را دارند.

References

1- Zahedi M, Rahimi E, Zahedi M, Momtaz H, Shojaii H. Prevalence of *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium* in marketed meat in Shahrekord in 2014. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2017; 19(2): 88-97.

2- Liaqat Z, Khan I, Azam S, Anwar Y, Althubaiti EH, Maroof L. Isolation and molecular characterization of extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* from chicken meat in Pakistan. *Plos one*. 2022; 17(6):e0269194.

3- Safarpordehkordi F, Yahaghi E, Khodaverdi Darian E. Prevalence of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Poultry Meat Supply in Isfahan. *Iran J Med Microbiol*. 2014; 8(2): 41-47.

4- Moghanni M, Dashtgard A, Barzegari-Esfeden Z. Prevalence of extended spectrum β-Lactamase producing *Escherichia coli* among hospitalized and outpatient children in Shohada Hospital in Qaen during 2017-2018. *KAUMS Journal (FEYZ)*. 2018; 22(2): 214-21.

5- Schito AM, Caviglia D, Piatti G, Zorzoli A, Marimpietri D, Zuccari G, *et al*. Efficacy of Ursolic Acid-Enriched Water-Soluble and Not Cytotoxic Nanoparticles against Enterococci. *Pharmaceutics*. 2021; 13(11): 1976.

6- Qian W, Wang W, Zhang J, Wang T, Liu M, Yang M, *et al*. Antimicrobial and antibiofilm activities of ursolic acid against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Antibiot.* 2020; 73(6): 382-91.

7- Hojati Z, Zamanzad B, Hashemzadeh M, Molaie R, Gholi- pour A. The FimH gene in uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infection. *Jundishapu J Microbiol.* 2015; 8(2).

8- Osek J, Dacko J. Development of a PCR-based method for specific identification of genotypic markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *J Vet Med*, Series B. 2001; 48(10): 771-8.

9- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; M100, 31st ed. Wayne, PA. 2023.

10- Pitts B, Hamilton MA, Zelver N, Stewart PS. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J Microbiologic Methods*. 2003; 54(2): 269–76.

11- Macêdo NS, Barbosa CR, Bezerra AH, Silveira ZD, da Silva L, Coutinho HD, *et al*. Evaluation of ellagic acid and gallic acid as efflux pump inhibitors in strains of *Staphylococcus aureus*. *Biology Open*. 2022; 11(10): bio059434.

12- Ghrairi T, Hani K. Enhanced bactericidal effect of enterocin A in combination with thyme essential oils against L. monocytogenes and E. coli O157: H7. *J Food Sci Technol*. 2015; 52: 2148-56.

13- **Martínez A, Manrique-Moreno M, Klaiss-Luna MC, Stashenko E, Zafra G, Ortiz C.** Effect of essential oils on growth inhibition, biofilm formation and membrane integrity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*. 2021; 10(12): 1474.

14- Scotti R, Stringaro A, Nicolini L, Zanellato M, Boccia P, Maggi F, *et al*. Effects of Essential Oils from Cymbopogon spp. and Cinnamomum verum on Biofilm and Virulence Properties of *Escherichia coli* O157: H7. *Antibiotics*. 2021; 10(2): 113.

15- Shakerimoghaddam A, Ghaemi EA, Jamali A. Effects of Zno nanoparticles on initial adhesion and fimH gene expression level of uropathogenic *Eschercia coli*. *Journal of Clinical and Basic Research*. 2017;1(3): 25-8.

16- Song X, Li J, Wang Y, Yuan G, Lai S, Yi H, *et al*. Synthesis and Antibacterial Activity of Ursolic Acid Derivatives. *Int J Sci*. 2019; 8(09): 20-3.

17- Sundaramoorthy NS, Mohan HM, Subramaniam S, Raman T, Selva Ganesan S, Sivasubamanian A, *et al*. Ursolic acid inhibits colistin efflux and curtails colistin resistant *Enterobacteriaceae*. *AMB Express*. 2019; 9: 1-2.

18- Wojnicz D, Tichaczek-Goska D, Korzekwa K, Kicia M, Hendrich A. Anti-enterococcal activities of pentacyclic triterpenes. *Adv Clin Exp Med*. 2017; 26(3): 483-90.

19- Fontanay S, Grare M, Mayer J, Finance C, Duval RE. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. *J Ethnopharmacol*. 2008; 120: 272–276.

20- Horiuchi K, Shiota S, Hatano T, Yoshida T, Kuroda T, Tsuchiya T. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biol Pharm Bull*. 2007; 30: 1147–1149.

21- Ultee A, Bennik MH, Moezelaar RJ. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(4): 1561-8.

22- Broniatowski M, Flasiński M, Zięba K, Miśkowiec P. Interactions of pentacyclic triterpene acids with cardiolipins and related phosphatidylglycerols in model systems. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1838:2530–2538.

23- Kim MJ, Kim CS, Park JY, Lim YK, Park SN, Ahn SJ, *et al*. Antimicrobial effects of ursolic acid against mutans streptococci isolated from Koreans. *Int J Oral* Sci. 2011; 36(1): 7-11.

24- Potera C. Forging a link between biofilms and disease, *Science*, 1999; 19: 1837-1838.

25- Jyothi JS, Putty K, Reddy YN, Dhanalakshmi K, Umair MH. Antagonistic effect of ursolic acid on Staphylococcal biofilms. *Vet World*. 2018;11(10): 1440.

26- Qin N, Tan X, Jiao Y, Liu L, Zhao W, Yang S, *et al*. RNA-Seq-based transcriptome analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm inhibition by ursolic acid and resveratrol. *Sci Rep*. 2014; 4(1): 5467.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 7, Issue 2, Autumn & Winter 2024, pages: 117-128

Investigating the effect of ursolic acid on growth and biofilm formation inhibition and in beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from poultry meat

Elmira Shemshadi [1], Leila Asadpour[2*]

1- Graduated Student, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
2- Associate Professor, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

Receive: May 19, 2024; Revise: November 11, 2024; Accept: November 30, 2024

10.22034/nfvm.2025.458471.1239

Summary

The challenge of today's medicine is to find alternatives in treatment of infections caused by antibiotic-resistant bacteria. Many types of molecules with antimicrobial potential are produced through the secondary metabolism of plants. This study was aimed to investigate the antimicrobial and anti-biofilm properties of ursolic acid against broad-spectrum beta-lactamase producing *E. coli* isolated from poultry meat. The inhibitory effect of ursolic acid against the test isolates was investigated using disk diffusion methods. MIC determination and its anti-biofilm effect were investigated using broth microdilution and microtiter plate methods respectively. Additionally, the effect of ursolic acid on the survival of *E. coli* has been checked by Time Kill assay and its effect on the expression level of *fim*H and *csg*A biofilm genes was analyzed by Real time-PCR. In this study, ursolic acid showed an inhibitory effect on the growth of all isolates, with MIC values ranging between 0.4 and 1.6 mg/ml. The percentage of biofilm inhibition in the conditions treated with the concentration of 1/2 MIC of ursulic acid in the 6 studied isolates varied between 51.2 and 67.3%. Furthermore, in the present study, treatment with sub-MIC concentrations of ursolic acid significantly decreased the expression of the *fim*H and *csg*A genes. The results of this study indicate the inhibitory effect of ersolic acid on the growth of beta-lactamase-producing *E. coli* isolates and the reduction of its biofilm formation ability. In vivo studies are required to further clarify its potential clinical application in controlling infections caused by drug-resistant isolates.

Keywords: *E. coli, Ursolic acid, antibiofilm, betalactamase*