

Evaluation of the Probiotic Effect of *Lactobacillus Rhamnosus* on blaCMY Beta- Lactamase Gene Expression in Clinical Isolates of *Escherichia Coli*

Karar Naser Alrahimi, Maryam Tehranipour*, Mahbobe Nakhai Moghadam

Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Received: March 04, 2023; Accepted: October 18, 2023

Abstract

Background and Aim: Escherichia coli, as a member of the Enterobacteriaceae family, belong to the group of facultative anaerobic gram-negative bacilli, and could be an important cause of hospital infections in intensive care units. Due to the widespread use of antibiotics, antibiotic resistance is one of the biggest causes of antibiotic treatment failure. Lactobacillus lactic acid bacteria (LAB) are one of the most important strains of probiotics, which have also been considered for their anti- cancer properties since the antimicrobial effects of some probiotics have been determined. This research aims to investigate the effect of Lactobacillus rhamnosus probiotic on blaCMY beta-lactamase gene expression in Escherichia coli clinical isolates.

Methods: In this experimental study, 60 Escherichia coli isolates were collected from hospitals in Mashhad and Neishabur and confirmed by microbiological and biochemical tests. The test to determine the drug sensitivity of the samples to antibiotics was done by the disc diffusion method. Then the resistant isolates were isolated and after re-cultivation, they were treated with probiotic extract. After that, their minimum growth inhibitory concentration (MIC) was compared to these antibiotics by conducting serial dilution method according to CLSI standards. Then, using real-time PCR, the expression of blaCMY gene in control and treatment samples was investigated and compared with each other. Statistical analysis was done with SPSS (independent t-test).

Results: The findings showed that the gene expression in samples treated with Lactobacillus rhamnosus probiotic extract was significantly reduced compared to the control samples ($P < 0.001$). The mean and standard deviation of the treatment group and control group are 0.35 ± 0.1 and 0.1 ± 1 respectively.

Conclusion: Lactobacillus rhamnosus probiotic extract exerted bactericidal effects through its binding ability, competitive power, and the power to inhibit uropathogens.

Keywords: *Escherichia coli*; blaCMY gene; antibiotic resistance; Lactobacillus rhamnosus probiotic

Please cite this article as: Naser Alrahimi K, Tehranipour M, Nakhai Moghadam M. Evaluation of the Probiotic Effect of *Lactobacillus Rhamnosus* on blaCMY Beta- Lactamase Gene Expression in Clinical Isolates of *Escherichia Coli*. Pejouhesh dar Pezeshki. 2023;47(4):71-81.

*Corresponding Author: Maryam Tehranipour; Email: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.



بررسی اثر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس بر بیان ژن بتالاکتماماز blaCMY در

جدايههای باليني اشريشيا کلى (*Escherichia Coli*)

کرار ناصرالرحيمى، مریم طهراني پور*، محبوبه نخعى مقدم

گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۳

چکیده

سابقه و هدف: اشريشيا کلى به عنوان یکی از اعضای خانواده انتروباکتریا سه که از گروه باسیل‌های گرم منفی بی‌هوای اختیاری به شمار می‌رود، می‌تواند از عوامل مهم ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی در بخش مراقبت‌های ویژه باشد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی به دلیل استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها، یکی از بزرگ‌ترین علل ناکامی در درمان آنتی‌بیوتیکی است. لاکتوباسیلوس‌ها از باکتری‌های استید لاکتیکی (LAB)، از مهم‌ترین سویه‌های پروبیوتیک‌ها به شمار می‌آیند که از نظر خواص ضد سرطانی نیز مورد توجه قرار گرفته‌اند. از آنجا که اثر ضد میکروبی برخی پروبیوتیک‌ها مشخص شده است؛ هدف از این تحقیق بررسی تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس بر بیان ژن بتالاکتماماز blaCMY در جدايههای باليني اشريشيا کلى است.

روش کار: در این مطالعه تجربی، تعداد ۶۰ ایزوله اشريشيا کلى از نمونه‌های بیمارستانی در شهر مشهد و نیشابور جمع‌آوری شد و توسط آزمایش‌های میکروبیولوژی و بیوشیمیابی تأیید شد. آزمایش تعیین حساسیت دارویی نمونه‌ها با روش انتشار از دیسک نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها انجام شد، سپس ایزوله‌های مقاوم جداسازی شدند و پس از کشت دوباره تحت تیمار با عصاره پروبیوتیک قرار گرفته و حداقل غلظت مماثعه کننده از رشد (MIC) آنها نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها توسط روش رقت‌های متوالی طبق استانداردهای CLSI انجام شد. سپس با استفاده از Real-time PCR (آزمون T IBM SPSS Statistical (27.0.1) انجام شد.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد که بیان ژن در نمونه‌های تیمار شده با عصاره پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس به طرز معناداری نسبت به نمونه‌های کنترل کاهش یافته است ($P < 0.001$). به طوری که میانگین و انحراف معیار گروه تیمار $1/35 \pm 0.01$ و گروه کنترل $1/1 \pm 0.01$ است.

نتیجه‌گیری: به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت احتمالاً عصاره پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس از طریق توانایی اتصال، قدرت رقابت و قدرت مهار یوروپاتوزن‌ها اثر باکتریوسیدی خود را اعمال کرده است.

وازگان کلیدی: اشريشيا کلى؛ ژن blaCMY؛ مقاومت آنتی‌بیوتیکی؛ پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Naser Alrahimi K, Tehranipour M, Nakhai Moghadam M. Evaluation of the Probiotic Effect of *Lactobacillus Rhamnosus* on blaCMY Beta-Lactamase Gene Expression in Clinical Isolates of *Escherichia Coli*. Pejouhesh dar Pezeshki. 2023;47(4):71-81.

*نویسنده مسئول مکاتبات: مریم طهرانی‌پور؛ آدرس پست الکترونیکی: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

مقدمه

داروهای بتالاکتمام یکی از فراوانترین و پر مصرف ترین داروهای تجویزی علیه این میکرووارگانیسم‌ها هستند که در سال‌های اخیر پیدایش گونه‌های مقاوم دارویی این ارگانیسم‌ها نگرانی‌های زیادی را برای پزشکان برای انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب در پروسه درمانی ایجاد کرده است (۷). اغلب آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتمام، با اثر بر دیواره سلولی باکتری‌ها اثر می‌کنند. ساخت آنزیم بتالاکتماز توسط باکتری‌ها، یکی از راه‌های دفاعی برد دارو و همچنین از دلایل ایجاد مقاومت به این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها است. بتالاکتمازها، دارای کلاس‌های مختلفی هستند که کلاس‌های DHA و CMY از فراوان‌ترین آنزیم‌های دخیل در بروز مقاومت‌های بتالاکتمی هستند. در عین حال تیپ‌های دیگر از این آنزیم‌ها از جمله ACC، EBC، FOX، MOX نیز در مطالعه‌های اخیر گزارش شده‌اند (۸). در باکتری‌های گرم منفی، تولید بتالاکتمازها می‌تواند تحت کنترل کروموزوم و یا پلاسمید باشد. این نوع بتالاکتمازها سبب ایجاد مقاومت گسترده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی چون؛ پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها شده و در نتیجه سبب کاهش اثر بخشی این آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مولد این نوع آنزیم‌ها می‌شود (۹). مصرف آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند آموکسی‌سیلین، راه اصلی درمان عفونت‌های باکتریانی است. متأسفانه با افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های قوی‌تر، خطر افزایش بیماری‌های عفونی جان انسان‌ها را تهدید می‌کند. امروزه روش‌های مختلفی به یاری انسان‌ها آمده تا شاید بتوان این مقاومت را کاهش داد (۱۰). در سال‌های اخیر مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در بین باکتری‌ها از جمله باکتری/شرشیاکلی گزارش شده است.

بنابراین احتمال می‌رود که استفاده از پروبیوتیک‌ها بتواند با کاهش مقاومت باکتری راهکار درمانی بهتری باشد.

هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس بر بیان ژن بتالاکتماز blaCMY در جدایه‌های بالینی اشرشیاکلی در شهر مشهد و نیشابور در بازه زمانی ۹ ماهه (۱۳۹۸-۱۳۹۹ شمسی) است.

استفاده از پروبیوتیک‌ها برای افزایش سلامت و بهبود دستگاه گوارش افراد پیشنهادی دیرینه است، ولی اختصاص دومین رتبه برای بیماری‌های حاد دستگاه گوارش در سراسر جهان نشان می‌دهد که این امر چندان مهم جلوه نکرده است (۱). در سال‌های اخیر مطالعه‌های انجام گرفته، تأیید کننده اثر ضد پاتوژنی پروبیوتیک‌ها است و این در حالی است که درمان با واسطه میکروبی در حال توسعه بوده و باکتری‌های مغاید در آن، به عنوان عوامل درمانی در اختلال‌های ایمنی و بیماری‌های عفونی ایفای نقش می‌کنند (۲).

مشخصه مهم باکتری‌های پروبیوتیک شامل توانایی این باکتری‌ها برای سرکوب ازدیاد ارگانیسم‌های بیماری‌زا و قدرت بیماری‌زا ای آنها است. میزان عفونت‌های باکتریایی در کشورهای توسعه یافته ۰-۵ درصد بیان شده است (۳). در این میان لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس/سیدوفیلوس جایگاه خاصی را به خود اختصاص داده‌اند. هر دو باکتری مذکور بیشترین گستردگی را از میان گونه‌های لاکتوباسیلوس، در حیوانات به خود اختصاص داده‌اند و این باکتری‌ها از محدود باکتری‌های لاکتوباسیلوس طبیعی موجود در روده انسان‌ها بوده و از این نظر دارای نقاط قوت و تفکر انگیز خاصی هستند (۴).

اشرشیاکلی، به عنوان یکی از اعضای خانواده انترباکتریا سه که از گروه باسیل‌های گرم منفی بی‌هوای اختیاری است و به طور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد (۵). شایع‌ترین عامل عفونت دستگاه ادراری است که حدود ۹۰ درصد عفونت‌های ادراری در زنان جوان را به خود اختصاص می‌دهد. علایم بالینی این عفونت به صورت تکرر ادرار، سوزش ادراری، خون در ادرار است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های اشرشیاکلی بسیار شایع است و این به سبب کسب فاکتورهای مقاومت متعدد است. بتالاکتمازها، آنزیم‌هایی هستند که سبب مقاومت به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف، آمینو پینی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، اکسی ایمونو سفالوسپورین‌ها، سفتراکسون، سفوتوکسیم، سفتازیدیم، سفاماکسین، سفوکسیتین، سفووتان، منوباکتم و مهارکننده‌های بتالاکتمازی می‌شود (۶). مجموعه

روش کار

الف) جداسازی و شناسایی جدایه های لاکتوباسیلوس رامنوسوس

در این مطالعه تجربی، تعداد ۶۰ ایزوله لاکتوباسیلوس رامنوسوس از آزمایشگاه تشخیص طبی در شهر مشهد و نیشابور جمع‌آوری شد و توسط آزمایش‌های میکروبیولوژی و بیوشیمیابی تأیید شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده به آزمایشگاه تحقیق‌های زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد منتقال یافت. نمونه‌ها ابتدا به منظور غنی‌سازی در محیط کشت Brain Heart Infusion Broth (BHI) و سپس به منظور رؤیت کلنجی میکروارگانیسم‌ها روی پلیت حاوی محیط BHI آگار به صورت خطی کشت و در دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت انکوبه شدند. برای جداسازی باکتری اشرشیاکلی از سایر باکتری‌های رشد یافته از محیط کشت اختصاصی اوزبین متیلن بلو (EMB) بهره گرفته شد. جهت اثبات سویه‌های اشرشیاکلی، از تست‌های بیوشیمیابی نظیر اوره آز، سیمون سیترات، (SIM) Sulfide Indole Motility، (TSI) Triple Sugar Iron VP-MR استفاده و با رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز و اکسیداز تأیید شد. جدایه‌ها در محیط LB Broth حاوی ۲۰ درصد گلیسرول در دمای ۸۰ - درجه سلسیوس نگهداری شد. لازم به ذکر است تمامی تست‌های مذکور از شرکت یاسین طب به صورت لیوفیلیزه خریداری شد.

ب) تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی

آزمایش تعیین حساسیت دارویی نمونه‌ها با روش انتشار از دیسک نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها انجام شد.

بدین منظور از محیط مولر-هینتون آگار و روش انتشار دیسک و مطابق با روش CLSI ۲۰۱۸ استفاده شد (۱۱). برای انجام این تست بعد از ایزوله کردن باکتری‌های مقاوم، مقداری از کلونی باکتری به وسیله انس برداشته شد و در سرم فیزیولوژی حل شد و سوسپانسیونی با کدورت نیم مک فارلند در سرم فیزیولوژی تهیه شد. سپس تلقیح سوسپانسیون باکتری در سطح محیط مولر-هینتون آگار به صورت یکنواخت و چمنی انجام شد. بعد از

مدت کوتاهی، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی به کمک پنس سترون در سطح محیط کشت قرار داده شد. پلیت‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. به وسیله خطکش اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد انجام شد. با کمک جدول استاندارد، حساسیت و مقاومت باکتری به هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها مشخص شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استفاده شده در این تحقیق از شرکت پادتن طب تهیه شد و شامل: آمریکاسین، جنتاماکسین، کلینداماکسین، ایمی‌پنم، تتراسایکلین، سفتازیدیم، اریتروماکسین، کلیستین، کلامفنیکل، سغازولین، سیپروفلوکساسین، سفتریاکسون و آمپی‌سیلین بود.

پس از طی ۴۸ ساعت کشت پرپویوتیک‌ها در حضور پرپویوتیک‌ها به منظور جداسازی مایع روی کشت لاکتوباسیلوس‌ها و بررسی اثر خاصیت مواد ضد میکروبی سوپرناتانت فالکون‌ها به مدت ۲۰ دقیقه و با دور rpm ۷۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای سانتریفیوژ داخل سانتریفیوژ یخچال دار قرار داده شدند (با علاوه متلاشی شدن باکتری و خروج محتويات سلول باکتری می‌شود) سپس مایع رویی در زیر هود و شرایط استریل برای اطمینان از نبود باکتری از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد و برای ارزیابی خاصیت ضد میکروبی آنها علیه سویه‌های اسینتو باکتری به لوله استریل منتقل شد. برای تعیین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی باکتری از روش میکرودایلوشن با غلظت‌های ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴، ۱/۱۲۸، ۱/۲۵۶، ۱/۵۱۲، ۱/۱۲۸ serial dilution method استفاده شد. بعد از اثر سوپرناتانت پرپویوتیک بر باکتری و تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی آنها (MIC)، نمونه RNA باکتری استخراج شد. کمترین غلظت مهارکنندگی لاکتوباسیلوس رامنوسوس روی سویه‌های بیماری‌زا (اشرشیاکلی) با روش ماکروبراث دایلوشن تعیین شد.

حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC)

برای تعیین MIC از روش میکرودایلوشن براث استفاده شد. در این روش از میکروپلیت ۲۴ چاهکی استفاده شد. اثر غلظت‌های مختلف پرپویوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس (۱۰۲۴ تا ۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در ممانعت از رشد ایزوله‌های

مورد سنجش قرار گرفت.

cDNA سنتر

پس از استخراج RNA سنتر cDNA انجام شد. سنتز cDNA با استفاده از cDNA Synthesis kit (یکتا تجهیزآرما، تهران) انجام شد.

Real- time PCR

میزان بیان ژن blaCMY با تکنیک real- time PCR بررسی شد.

برای تعیین میزان بیان ژن بتالاکتم CMY از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده با نرم افزار الیگو ۷ طراحی و به شرکت سیناکلون ایران برای سنتز سفارش داده شدند. توالی پرایمر در جدول ۱ آمده است.

اشریشیاکلی بررسی شد. از پودر آنتیبیوتیک کلرامفینیکل به عنوان کنترل استفاده شد. پس از تلقیح باکتری‌ها با غلظت OD₆₂₀ = 0.01 در چاهک‌ها، میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C در انکوباتور قرار گرفت. پس از انکوباسیون، اولین چاهکی که در آن رشدی مشاهده نشد به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

استخراج RNA باکتری

بعد از بررسی اثر سوپرناکت پروبیوتیک بر باکتری استخراج Total Kit mini RNA باکتری انجام شد. برای این کار از Extraction RNA (یکتا تجهیزآرما، ایران) استفاده کردیم. پس از استخراج RNA برای بررسی غلظت و کمیت (Termo, USA) استخراج شده، نمونه‌های RNA با نانودرایپ (RNA

جدول ۱- توالی پرایمر مورد استفاده برای بررسی بیان ژن blaCMY و 16sRNA

Genes	Primer Sequence	TM
blaCMY	Forward: 5'- ATGCACCCATGAGGCTTCA-3' Reverse: 5'- GTGTCCAGGCTCAAATGT-3'	57.87 °C 56.67 °C
16sRNA	Forward: 5" CGA GTG GCG GAC GGG TGA GT -3' Reverse: 5" TCG ACA TCG TTT ACG GCG TGG A -3'	59.35 °C 59.35 °C

جدول ۲- مشخصات ترموسایکلر در real-time PCR

شماره	مرحله	درجه حرارت	مدت زمان
۱	واسرشته شدن اولیه	۹۴	۳۰ ثانیه
۲	واسرشته شدن اولیه	۹۴	۱ دقیقه
۳	اتصال پرایمر	۵۸	۱ دقیقه
۴	طويل شدگی	۷۲	۱ دقیقه
۵	طويل شدگی نهایی	۷۲	۷ دقیقه
۶-۴	چرخه	۳۵	

آنالیز آماری

محاسبه آماری این پژوهش با استفاده از آزمون T مستقل و برنامه IBM SPSS Statistical(27.0.1) انجام شد. چنانچه P-value حاصل کمتر از ۵ درصد باشد، آنالیز ما معنادار خواهد بود.

واکنش ۲۰ میکرولیتر real- time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. این واکنش توسط کیت Genet (کره جنوبی) انجام شد. به این منظور ۱۰ میکرولیتر Prime Qmaster mix (2x) with SYBERgreen ۵ میکرولیتر Depc water، یک میکرولیتر از cDNA هر پرایمر، یک میکرولیتر از dye Rox و دو میکرولیتر از Applied ABI StepOne Plus(USA) انجام شد. برنامه دمایی مورد استفاده مطابق جدول ۲ در ۳۵ چرخه بیان شده است.

آنالیز داده‌ها در نمونه‌های تیمارشده و کنترل به کمک معادله داده‌ها و رسم نمودارهای مربوطه از Relative LightCycler استفاده شد. داده‌های مربوط به Software Quantification تغییر بیان ژن blaCMY با فرض $\Delta\Delta CT$ با روش کارآیی ۱۰۰ درصد و با استفاده از آزمون آماری T مستقل در دو گروه تحلیل شد. در نهایت برای تایید انجام واکنش محصول real- time PCR بر روی ژل اکارز ۱٪ الکتروفورز شد.

یافته‌ها

جنتامايسین سفتازیديم، توپرامايسين سپيروفلوكاساسين، ايمى پنم، سفپيم، كلسيتين، آمپي سيلين و سفوناكسيم تعين شد. بررسى هاله با توجه به استاندارد CLSI انجام شد و نتایج به صورت حساس (S)، نيمه حساس (IM) و مقاوم (R) گزارش شد.

کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی

در اين بررسى ميزان حساسيت باكتري بيمارزا نسبت به آنتىبيوتیک‌های رايچ از جمله آنتىبيوتیک‌های آميکاسين،

جدول ۳- نتایج آزمون آنتىبيوتیک

دیسک آنتىبيوتیک	حساس (درصد)	نیمه حساس (درصد)	مقاآم (درصد)
آميکاسين (AMP_{10})	.	.	%61
جنتامايسين (GM_{10})	(%).0	(%).0	49(٪100)
كلينندامايسين (CC_{2})	%0	%0	(٪100)
امي پنم (IMp_{10})	(٪25/٪36)9	(٪25/٪36)9	(٪24/٪69)17
ترراسايكلين (TE_{30})	(%).0	(%).0	(٪100)49
سفتايزيديم (CAZ_{30})	(%).0	(%).0	(٪100)49
كلامفنبيكل (CH_{30})	(٪53/٪26)31	(٪24/٪28)7	(٪22/٪44)11
سفازولين (CZ_{30})	%0	%0	%100
سيپروفلوكاساسين ($\text{CPI}5$)	%0	%0	%100
سفترياكسون (CRX)	%0	%0	%100
آمپي سيلين ($\text{AMP}10$)	%0	%0	%100
كليستين (CO)	%0	%0	%100
اريترومايسين ($\text{E}15$)	(%).0	(%).0	(٪100)49

جدول ۴- مقادیر نانودرآپ نمونه‌ها

نمونه	غلهٔ RNA با تیمار ترکیب نانوذره و عصاره بروپیوتیک
۱	۰/۸۷۳
۲	۱/۲
۳	۰/۹۱
۴	۱/۳۲۳
۵	۰/۷۵
۶	۰/۹۹۸
سویه استاندارد	۱/۴۱

در اين تحقیق سوپرنانت پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس نهیه شد و سپس اثر آن را روی سویه‌های مقاوم شده باكتري اشرشیا کلی به آنتىبيوتیک سولفاماتوکسازول / تری متیپریم و لسترپتومايسين و ايمپینم مطالعه شد.

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

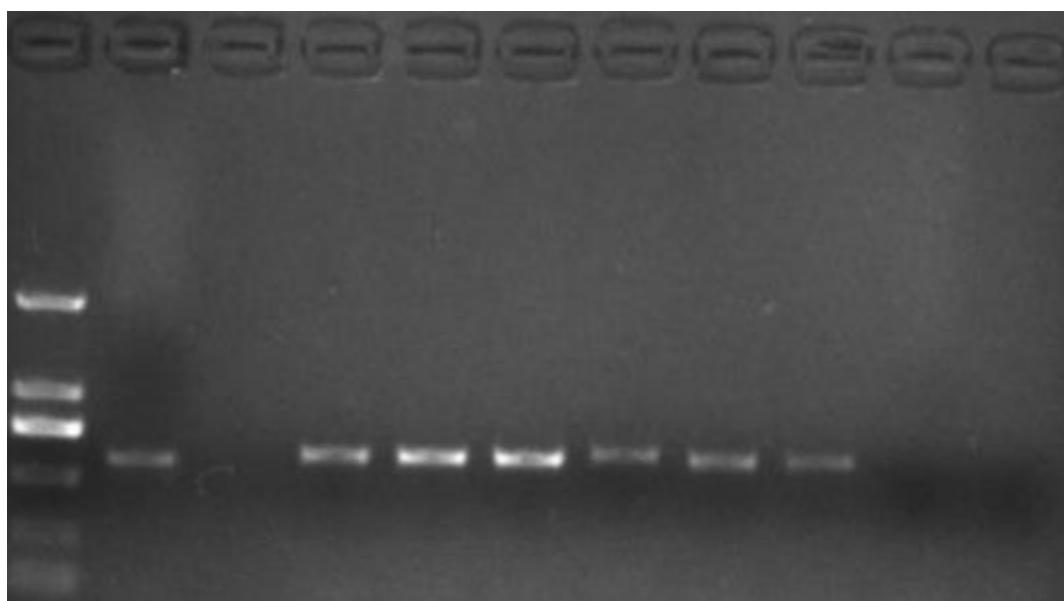
در اين مطالعه کمترین غلظت مهار کننده نانوذره ۰/۰۶۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شد.

استخراج Total RNA

مقادير Ratio OD در طول موج نوري (۲۶۰/۲۸۰) و غلظت RNA اندازه‌گيری شده توسط دستگاه نانودرآپ گزارش شده است.

شده است. با توجه به حرکت DNA روی ژل، صحت سنتز cDNA تأیید شد.

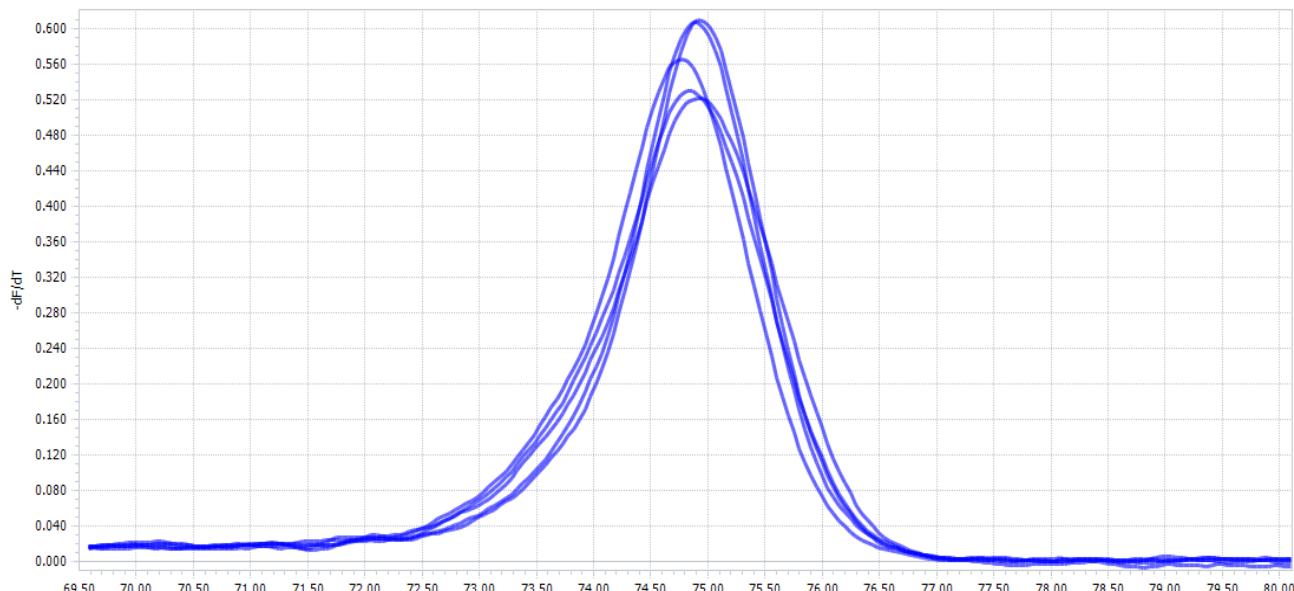
cDNA سنتز
نتایج ژل الکتروفورز پس از سنتز cDNA در شکل ۱ نشان داده



شکل ۱- الکتروفورز cDNA

دست آمد که با توجه به منفی بودن اعداد به دست آمده، در نتیجه کاهش بیان ژن در آنها به اثبات رسید.

نتایج Real-time PCR
پس از آنالیز داده‌های ΔCT نمونه‌های تست و کنترل، میزان آن در هر باکتری مشخص شد و درنهایت مقدار $\Delta\Delta CT$ نیز به



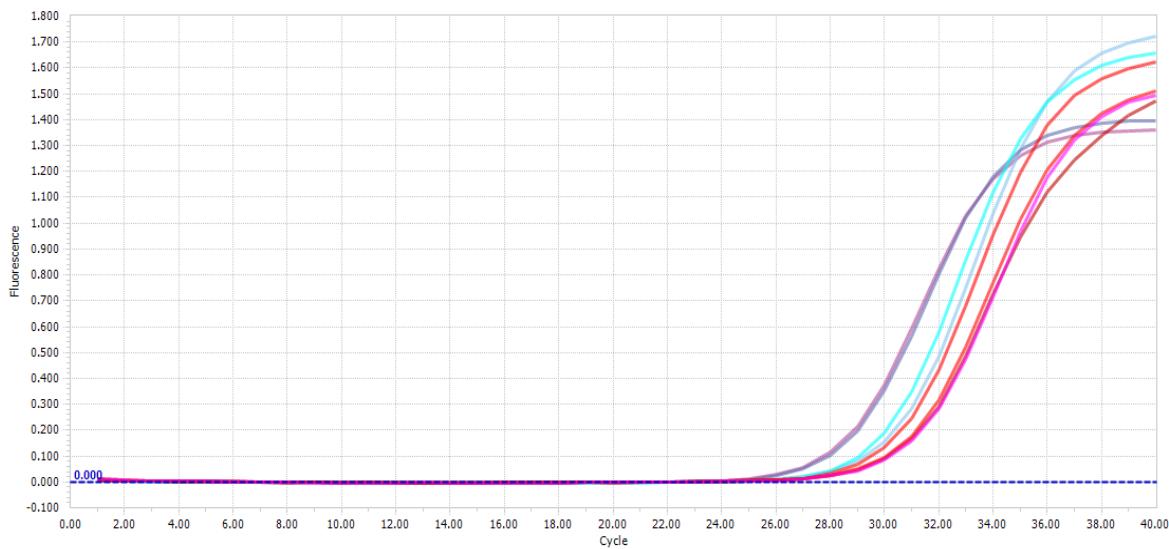
نمودار ۱- نمودار دمای ذوب

نمونه‌های *E. Coli* بعد از تیمار نانوذره نقره دارای Ct های بیشتر بوده که بیشترین میزان Ct₄ و در نتیجه کمترین میزان بیان هستند. میزان Ct، میزان بیان ژن مقاومت blaCMY در نمونه‌های باکتری پس از تیمار با سوپرناнт پروبیوتیک در مقایسه با نمونه باکتری قبل از تیمار به میزان معناداری کاهش یافته است ($P-value \leq 0.05$) بطوریکه میانگین و انحراف معیار گروه تیمار 0.1 ± 0.35 و گروه کنترل 0.1 ± 1 است.

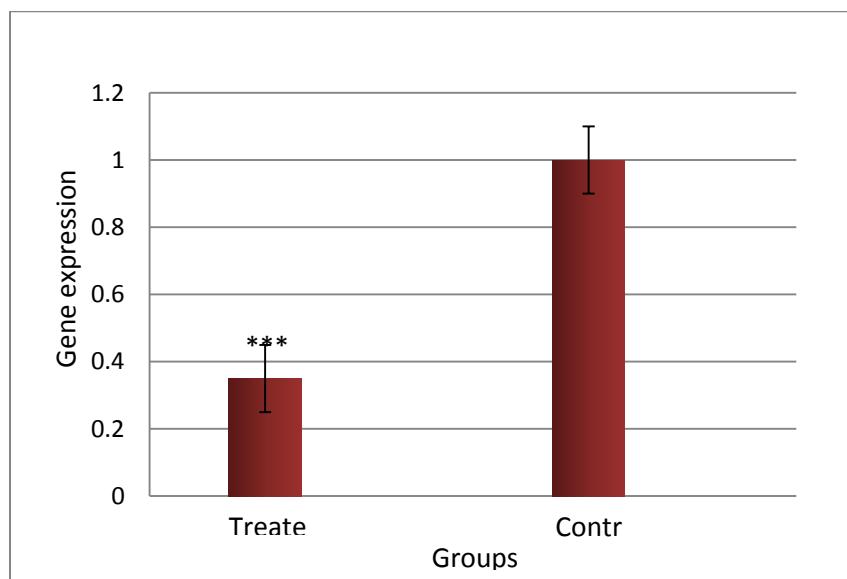
برای اطمینان از اختصاصی بودن قطعه‌های تکثیر شده ژن blaCMY مشاهده می‌شود که منحنی ژن مورد سنجش در تمام نمونه‌ها با هم منطبق و به صورت یک قله است (نمودار ۱).

منحنی تکثیر دستگاه Real-time PCR

همان‌طور که در مورد نمودار ۳ ذکر شد، ژن‌هایی که دارای Ct کمتری هستند در نتیجه دارای بیان بیشتری هستند که در اینجا ژن‌های کنترل داخلی یا همان ژن ۱۶sRNA از سیکل پایین شروع تر به تکثیر کرده و در نهایت بیان بیشتری دارند و ژن‌های



نمودار ۲- منحنی تکثیر Real-time PCR در نمونه‌های مورد بررسی.



نمودار ۳- میزان بیان ژن blaCMY در نمونه‌های تحت تیمار با (سوپرناнт پروبیوتیک) با نمونه کنترل.

*** نشان دهنده سطح معناداری ($p < 0.001$)، مقدار p در این مقایسه = ۰ است.

بحث

صرف آنتی بیوتیک هایی مانند آموکسی سیلین، راه اصلی درمان عفونت های باکتریایی است. متأسفانه با افزایش مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک های قوی تر، خطر افزایش بیماری های عفونی جان انسان ها را تهدید می کند. امروزه روش های مختلفی به یاری انسان ا آمده تا مصرف این مقاومت ها روز به روز کاهش یابد (۱۷). امروزه محققان به دنبال راه هایی برای کاهش مقاومت باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک ها هستند. پژوهش حاضر با هدف ارزیابی اثر ضد باکتریایی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس در برابر عفونت مقاوم به سفالوسپورین *E. Coli blaCMY* هستند در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

در سال ای اخیر مطالعه های انجام شده تأیید کننده آثار ضد بیماری زایی پروبیوتیک ها است. به دلیل تولید عامل های ضد میکروبی متعدد، پروبیوتیک ها به عنوان عوامل درمانی و پیشگیری کننده از بیماری های عفونی ایجاد شده با پاتوژن های دهانی روده ای و ادراری- تناسلی مطرح شده اند (۱۸). ویژگی مهم باکتری های پروبیوتیک توانایی این باکتری ها برای مهار افزایش تعداد میکرووار گانیسم های بیماری زا و نیز مهار قدرت بیماری زایی آنها است. باکتری های اسید لاکتیک از قبیل جنس لاکتوباسیلوس با تولید عامل های ضد میکروبی و نیز به کارگیری مکانیسم های مختلف دارای عملکرد بسیار مؤثری در این راستا هستند (۱۹).

به طور کلی نحوه عملکرد لاکتوباسیلوس های پروبیوتیکی در تداخل با بیماری زاهای دستگاه ادراری تناسلی بسیار متنوع است و این تنوع به دلیل چهار ویژگی اصلی این باکتری ها از جمله توانایی اتصال، قدرت رقابت و قدرت مهار یوروپاتوژن ها است. همچنین باکتری های پروبیوتیک با توانایی تجمع سلولی با میکروب های بیماری زا مجتمع می شوند و با آثار ضد اتصالی خود مانع از رسیدن و اتصال باکتری های پاتوژن به سلول هدف میزبان شان می شوند (۲۰).

در این پژوهش پس از استخراج عصاره از پروبیوتیک، فعالیت ضد باکتریایی آن در برابر سویه های باکتری *Escherichia coli* بررسی شد و حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) پروبیوتیک به

یافته ها نشان داد که بیان ژن در نمونه های تیمار شده با عصاره پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس به طرز معناداری نسبت به نمونه های کنترل کاهش یافته است (۰/۰۰۱) به طوری که میانگین و انحراف معیار گروه تیمار $0/1 \pm 0/35$ و گروه کنترل $0/1 \pm 1$ است. احتمالاً عصاره پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس از طریق توانایی اتصال، قدرت رقابت و قدرت مهار یوروپاتوژن ها اثر باکتریوسیدی خود را اعمال کرده است. مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه های اشرشیا کلی بسیار شایع است و این به سبب کسب فاکتور های مقاومت متعدد است (۱۲). نظر به افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در پاتوژن های روده ای، به نظر می رسد اتخاذ یک داروی مناسب برای درمان این عفونت ها با مشکل مواجه شده است، بنابراین تعیین الگوی مقاومت دارویی به صورت منطقه ای و دوره ای برای این باکتری ضروری به نظر می رسد. مطابق با مطالعه حاضر، عباسپور و همکاران (۱۳) در سال ۱۳۹۳ نشان دادند که $23/3$ درصد از جایه های شیگلا سونئی به سفتیریاکسون و $24/4$ درصد به سفیکسیم، مقاوم بوده اند. در آن مطالعه $31/6$ درصد از سویه ها MDR بودند و بیشترین میزان مقاومت 40 درصد سویه ها مربوط به سفپیم بود. نتایج نشان داد که ارتباط معناداری بین حضور ژن های ESBLs و بروز مقاومت به سفالوسپورین ها نظیر سفپیم وجود دارد. در مطالعه ای که بونت و همکاران در سال ۲۰۰۷ در کشور بربیل انجام دادند، ژن بتالاکتماز β -CMY-۲ و AmpC برسی شدند. مطابق با مطالعه پیش رو، در مطالعه بونت و همکاران تمامی سویه های دارای مقاومت چندگانه دارای ژن CMY بودند (۱۴). حسینیان و همکاران در تحقیق های خود در سال ۲۰۱۱ در پاکستان نشان دادند که فراوانی ژن M-CTX و CMY به ترتیب $57/7$ درصد و 50 درصد بود (۱۵). مندونکا و همکاران در سال ۲۰۰۷ در پرتقال نشان دادند که M-۲ blaCTX- M-۲ دارای بیشترین فراوانی در بین سایر ژن ها در میان ایزو له های جداسازی شده بودند (۱۶).

این اختلاف می تواند در نتیجه اختلاف در سال انجام مطالعه، فاصله جغرافیایی، تنوع سویه ها و حجم نمونه باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه آقای کرار ناصر الرحیمی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی سلولی مولکولی از دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی مشهد بود.

بدین‌وسیله از مساعدت دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد برای در اختیار گذاشتن مواد و دستگاه‌های مورد نیاز برای انجام این پژوهش قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسنده‌گان، تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

روش ماکروپراث دایلوشن تعیین و به دنبال آن آزمون تعیین حداقل غلظت کشنندگی (MBC) نیز برای هر یک از نمونه‌ها انجام شد.

MIC و MBC پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس در برابر باکتری ذکر شده به ترتیب برابر با ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. با توجه به نتایج MIC و MBC پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس در برابر سویه‌های مورد مطالعه، مشخص شد که پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس پتانسیل ضد باکتریایی خوبی علیه باکتری‌های گرم منفی دارد.

نتایج مطالعه حاضر مبنی بر استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس گواه آن بود که در گونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک که همگی بیان ژن *blaCMY* را نشان می‌دادند تیمار با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس بیان ژن *blaCMY* را نسبت به گونه‌های کنترل به طور معناداری ($P < 0.001$) کاهش داده است (نمودار ۳-۴).

پیشنهاد می‌شود با توجه به شیوع بالای ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتم در سویه‌های اشرشیا کلی، مراقبتها دقيق پزشکی و استفاده صحیح و به موقع از آنتی‌بیوتیک‌های مناسب به همراه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس برای جلوگیری از شیوع سویه‌های مقاوم ضروری است.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر مشخص شد که همه سویه‌های اشرشیا کلی مقاوم دارای بیان ژن *blaCMY* بودند که شایع‌ترین ژن بتالاکتماز وسیع‌الطیف در این سویه‌ها *blaCMY* است. در نمونه‌های تیمارشده با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس بیان ژن *blaCMY* به شدت نسبت به نمونه‌های کنترل کاهش یافته است به طوری که این کاهش معنادار است.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه در دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی مشهد بررسی و با کد اخلاق IR.IAU.MSHD.REC.1399.200 ثبت شده است.

References

1. Sanders ME., Mediville RW. Considerations for useof probiotic bacteria to modulate human health. *Journal of Nutrition* 2000; 130: 384-390.
2. Reid G. & Burton J. Use of Lactobacillus to preventinfection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection* 2002; 4: 319-324.
3. Preliminary Foodnet data on the incidence of food borne illness-selected sites United States, 2002. MMWR More Mortal Wkly rep, 2003; P52: 340.
4. Saavedra J. Probiotics and infectious diarrhea.American journal of Gastroenterology.2000.:58:1101-1109
5. Mohammadi-Mehr M, Feizabadi M. Antimicrobial resistance pattern of Gram-negative bacilli isolated from patients at ICUs of Army hospitals in Iran. *Iranian journal of microbiology* 2011;3(1):26.
- 6.Olusoga Ogbolu D, Terry Alli OA, Olanipekun LB, Ojo OI, Makinde O. Faecal carriage of extended-specterum beta-lactamase (ESBL)-producing commensal Klebsiella Pneumoniae and Escherichia coli from hospital out-patients in Southern Nigeria. *Inter J Medi Medic Sci* 2013; 5(3): 97-105.
- 7.Peter-Getzlaff S, Polsfuss S, Poledica M, Hombach M, Giger J, Bottger EC, et al. Detection of AmpC beta-lactamase in Escherichia coli: comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. *Journal of clinical microbiology* 2011;49(8):2924-32.
- 8.Mendonça N, Leitão J, Manageiro V, Ferreira E, Caniça M. Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-Mproducing escherichia coli clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(6):1946-55
- 9.Bratu S, Brooks S, Burney S, Kochar S, Gupta J, Landman D, Quale J. Detection and spread of Escherichia coli possessing the plasmid-borne carbapenemase KPC-2 in Brooklyn, New York. *Clin Infect Dis* 2007 Apr; 44(7):972-5.
- 10.Kuntaman.K, Lestari.E, Juliëtte A, Severin, Irma M. Kershof, Mertaniasih.N, Purwanta.M, Hadi.U, James R. Johnson, Belkum, and.A and Henri A. Fluoroquinolone-resistant Escherichia coli, Indonesia. *Emerg Infect Dis* 2005 Sep; 11(9).
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th ed. CLSI supplement M100S. CLSI, PA. 2018;38-40.
- 12.Mohammadi-Mehr M, Feizabadi M. Antimicrobial resistance pattern of Gram-negative bacilli isolated from patients at ICUs of Army hospitals in Iran. *Iranian journal of microbiology* 2011;3(1):26.
- 13.Abbaspour S, Mardaneh J, Ahmadi K. The survey of shigellosis frequency and determination of antibiotic resistance profile of isolated strains from infected children in Tehran. *Iran South Med J* 2014 Apr; 17(1): 42-48.
14. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum βlactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1-14.
- 15.Hussain M, Hasan F, Shah AA, et al. Prevalence of class A and AmpC β-lactamases in clinical Escherichia coli isolates from Pakistan Institute of Medical Science, Islamabad, Pakistan. *Jpn J Infect Dis* 2011;64(3):249- 252.
16. Mendonça N, Leitão J, Manageiro V, Ferreira E, Caniça M. Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-Mproducing escherichia coli clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(6):1946-55
- 17.Aitken R.J., Creely K.S. and Tran C.L. Nanoparticles: An occupational hygiene . hygiene review. *Health and safity* 2004;256;13-24
- 18.Servin AL. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 2004; 28 (4): 405- 40.
19. Asahara T., Nomoto K., Watanuki M., Yokokura T. Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic Lactobacillus casei in a murine model of Escherichia coli urinary tract infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45 (6): 1751- 60
- 20.Collado MC., Meriluoto J., Salminen S. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens. *Journal of Microbiological methods* 2007; 71 (1): 71- 4