

## 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  $0.35 \pm 0.1$  and  $0.1 \pm 1$  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 بتالاکتاماز *blaCMY* در جدایه‌های بالینی اشریشیا کلی (*Escherichia Coli*)

کرار ناصرالرحیمی، مریم طهرانی پور\*، محبوبه نخعی مقدم

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۶

### چکیده

**سابقه و هدف:** اشریشیا کلی به عنوان یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه که از گروه باسیل‌های گرم منفی بی‌هوازی 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 بتالاکتاماز *blaCMY* در جدایه‌های بالینی اشریشیا کلی است.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی، تعداد ۶۰ ایزوله اشریشیا کلی از نمونه‌های بیمارستانی در شهر مشهد و نیشابور جمع‌آوری شد و توسط آزمایش‌های میکروبیولوژی و بیوشیمیایی 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 ممانعت‌کننده از رشد (MIC) آنها نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها توسط روش رقت‌های متوالی طبق استانداردهای CLSI انجام شد. سپس با استفاده از Real-time PCR بیان ژن *blaCMY* در نمونه‌های کنترل و تیمار بررسی و مقایسه شد. آنالیز آماری با دستگاه IBM SPSS Statistical (27.0.1) (آزمون T مستقل) 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  $0/1 \pm 0/35$  و گروه کنترل  $1 \pm 0/1$  است.

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

**واژگان کلیدی:** اشریشیا کلی؛ 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 طهرانی پور؛ آدرس پست الکترونیکی: maryam\_tehranipour@mshdiau.ac.ir

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

## مقدمه

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 مفید 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 ارگانسیم‌های بیماری‌زا و قدرت بیماری‌زایی آنها است. میزان عفونت‌های باکتریایی در کشورهای توسعه یافته ۱۰-۵ درصد بیان شده است (۳). در این میان لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس 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 معدود 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 انتروباکتریاسه که از گروه باسیل‌های گرم منفی بی‌هوازی 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. علائم 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. بتالاکتامازها، آنزیم‌هایی هستند که سبب مقاومت به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف، آمینو پینی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، اکسی‌ایمونو سفالوسپورین‌ها، سفتریاکسون، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفامایسین، سفوکسیتین، سفوتتان، منوباکتام و مهارکننده‌های بتالاکتامازی می‌شود (۶). مجموعه

داروهای بتالاکتام یکی از فراوان‌ترین و پرمصرف‌ترین داروهای تجویزی علیه این میکروارگانسیم‌ها هستند که در سال‌های اخیر پیدایش گونه‌های مقاوم دارویی این ارگانسیم‌ها نگرانی‌های زیادی را برای پزشکان برای انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب در پروسه درمانی ایجاد کرده است (۷). اغلب آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، با اثر بر دیواره سلولی باکتری‌ها اثر می‌کنند. ساخت آنزیم بتالاکتاماز توسط باکتری‌ها، یکی از راه‌های دفاعی برضد دارو و همچنین از دلایل ایجاد مقاومت به این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها است. بتالاکتامازها، دارای کلاس‌های مختلفی هستند که کلاس‌های DHA و CMY از فراوان‌ترین آنزیم‌های دخیل در بروز مقاومت‌های بتالاکتامی 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 بتالاکتامازها می‌تواند تحت کنترل کروموزوم و یا پلاسمید باشند. این نوع بتالاکتامازها 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 باکتریایی 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 اشرشیاکلی 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 بتالاکتاماز blaCMY در جدایه‌های بالینی اشریشیاکلی در شهر مشهد و نیشابور در بازه زمانی ۹ ماهه (۱۳۹۹-۱۳۹۸ شمسی) است.

## 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 بیوشیمیایی تأیید شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده به آزمایشگاه تحقیق‌های زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد انتقال یافت. نمونه‌ها ابتدا به منظور غنی‌سازی در محیط کشت Brain Heart Infusion Broth (BHI) و سپس به منظور رؤیت کلنی میکروارگانسیم‌ها 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 /شرشیاکلی از سایر باکتری‌های رشد یافته از محیط کشت اختصاصی ائوزین متیلن بلو (EMB) بهره گرفته شد. جهت اثبات سویه های /شرشیاکلی، از تست های بیوشیمیایی نظیر اوره آز، سیمون سترات، (TSI) Triple Sugar Iron، (SIM) Sulfide Indole Motility، VP-MR استفاده و با رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز و اکسیداز تأیید شد. جدایه ها 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 آنتی بیوتیکی

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 2018 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: آمیکاسین، جنتامایسین، کلیندامایسین، ایمی‌پنم، تتراسایکلین، سفنازیدیم، اریترومایسین، کلیستین، کلرامفنیکل، سفازولین، سیپروفلوکساسین، سفتریاکسون و آمپی‌سیلین بود.

پس از طی ۴۸ ساعت کشت پروبیوتیک‌ها در حضور پروبیوتیک‌ها به منظور جداسازی مایع روی کشت لاکتوباسیلوس‌ها و بررسی اثر خاصیت مواد ضد میکروبی سوپرناتانت فالكون‌ها به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۷۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای سانتریفوژ داخل سانتریفوژ یخچال دار قرار داده شدند (باعث متلاشی شدن باکتری و خروج محتویات 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 اسپینتو باکتر 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 بر اساس *serial dilution method* استفاده شد. بعد از اثر سوپرناتانت پروبیوتیک بر باکتری و تعیین کم‌ترین غلظت مهارکنندگی آنها (MIC)، نمونه RNA باکتری استخراج شد. کمترین غلظت مهارکنندگی لاکتوباسیلوس رامنوسوس روی سویه‌های بیماری‌زا /شرشیاکلی با روش ماکروبراث دایلوژن تعیین شد.

#### حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC)

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

مورد سنجش قرار گرفت.

### سنتز cDNA

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

### Real- time PCR

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

برای تعیین میزان بیان ژن بتالاکتاماز *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.

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

Genes	Primer Sequence	TM
<i>blaCMY</i>	Forward: 5'- ATGCACCCATGAGGCTTTCA-3'	57.87 °C
	Reverse: 5'- GTGTCCAGGCTCCAAATGT-3'	56.67 °C
16sRNA	Forward: 5" CGA GTG GCG GAC GGG TGA GT -3'	59.35 °C
	Reverse: 5" TCG ACA TCG TTT ACG GCG TGG A -3'	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	طویل شدگی	۷۲	۱ دقیقه
۵	طویل شدگی نهایی	۷۲	۷ دقیقه
چرخه ۴-۲		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.

اشریشیاکلی بررسی شد. از پودر آنتی بیوتیک کلرامفنیکل به عنوان کنترل استفاده شد. پس از تلقیح باکتری‌ها با غلظت  $OD_{620} = 0.01$  در چاهک‌ها، میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^{\circ}C$  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 سوپرناتانت پروبیوتیک بر باکتری استخراج RNA باکتری انجام شد. برای این کار از Total Kit mini (Extraction RNA یکتا تجهیز آزما، ایران) استفاده کردیم. پس از استخراج RNA برای بررسی غلظت و کمیت RNA استخراج شده، نمونه‌های RNA با نانودراپ (Termo, USA)

واکنش 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 هر پرایمر، یک میکرولیتر از dye Rox و دو میکرولیتر از cDNA استفاده شد. واکنش مورد نظر در دستگاه Applied ABI StepOne Plus(USA) انجام شد. برنامه دمایی مورد استفاده مطابق جدول ۲ در ۳۵ چرخه بیان شده است.

آنالیز داده‌ها در نمونه‌های تیمار شده و کنترل به کمک معادله داده‌ها و رسم نمودارهای مربوطه از Relative LightCycler Software Quantification استفاده شد. داده‌های مربوط به تغییر بیان ژن *blaCMY* با فرض  $2^{\Delta\Delta CT}$  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 اگارز ۱٪ الکتروفورز شد.

## یافته‌ها

### کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی

در این بررسی میزان حساسیت باکتری بیمارزا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج از جمله آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین،

جنتامایسین سفنازیدیم، تورامایسین سیپروفلوکساسین، ایمی پنم، سفپیم، کلیستین، آمپی سلین و سفوناکسیم تعیین شد. بررسی هاله با توجه به استاندارد CLSL انجام شد و نتایج به صورت حساس (S)، نیمه حساس (IM) و مقاوم (R) گزارش شد.

جدول ۳- نتایج آزمون آنتی بیوگرام

مقاوم (درصد)	نیمه حساس (درصد)	حساس (درصد)	دیسک آنتی‌بیوتیک
۶۱٪	۰	۰	آمیکاسین (AMP <sub>10</sub> )
۴۹ (۱۰۰٪)	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)	جنتامایسین (GM <sub>10</sub> )
۱۰۰٪	۰٪	۰٪	کلیندامایسین (CC <sub>2</sub> )
۱۱۷ (۲۴/۶۹٪)	۹ (۲۵/۳۶٪)	۱۳ (۲۹/۵۳٪)	ایمی پنم (IMp <sub>10</sub> )
۴۹ (۱۰۰٪)	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)	تتراسایکلین (TE <sub>30</sub> )
۴۹ (۱۰۰٪)	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)	سفنازیدیم (CAZ <sub>30</sub> )
۱۱ (۲۲/۴۴٪)	۷ (۲۴/۲۸٪)	۳۱ (۵۳/۲۶٪)	کلرامفنیکل (CH <sub>30</sub> )
۱۰۰٪	۰٪	۰٪	سفازولین (CZ <sub>30</sub> )
۱۰۰٪	۰٪	۰٪	سیپروفلوکساسین (CPI <sub>5</sub> )
۱۰۰٪	۰٪	۰٪	سفتریاکسون (CRX)
۱۰۰٪	۰٪	۰٪	آمپی سلین (AMP <sub>10</sub> )
۱۰۰٪	۰٪	۰٪	کلیستین (CO)
۴۹ (۱۰۰٪)	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)	اریترومایسین (E15)

جدول ۴- مقادیر نانودراپ نمونه‌ها

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

در این تحقیق سوپرناتانت پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس نهیه شد و سپس اثر آن را روی سویه‌های مقاوم شده باکتری *اشرشیا کلی* به آنتی‌بیوتیک سولفامتوکسازول/ تری متوپریم و لسترپتومایسین و ایمینم مطالعه شد.

### حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

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

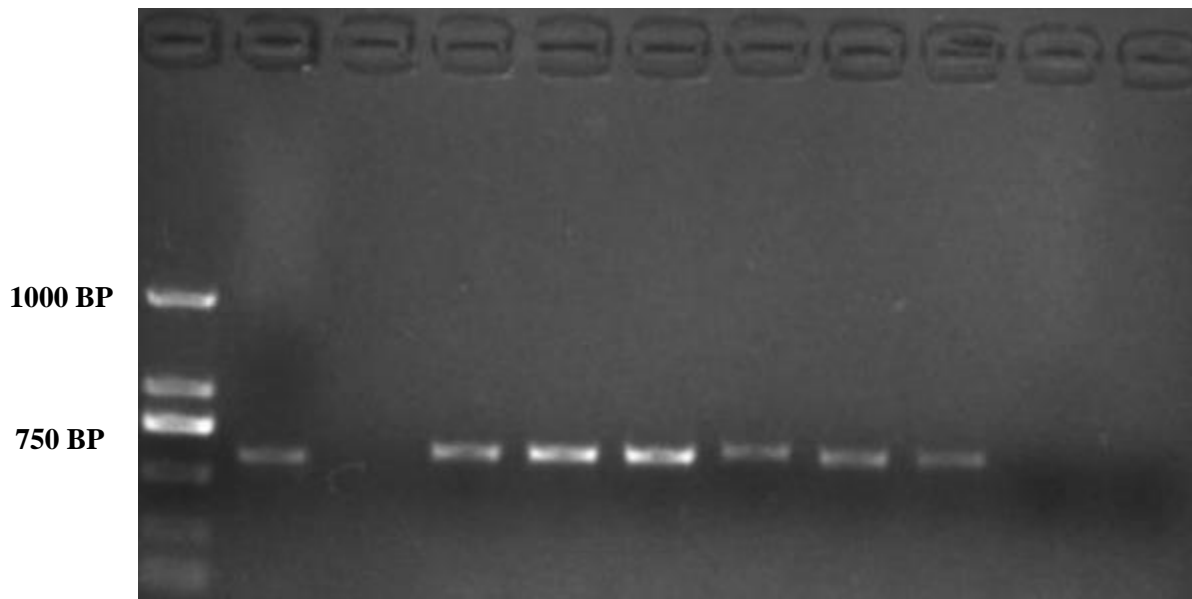
### استخراج Total RNA

مقادیر Ratio (مقدار OD در طول موج نوری ۲۶۰/۲۸۰) و غلظت RNA اندازه‌گیری شده توسط دستگاه نانودراپ گزارش شده است.

**سنتز cDNA**

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

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

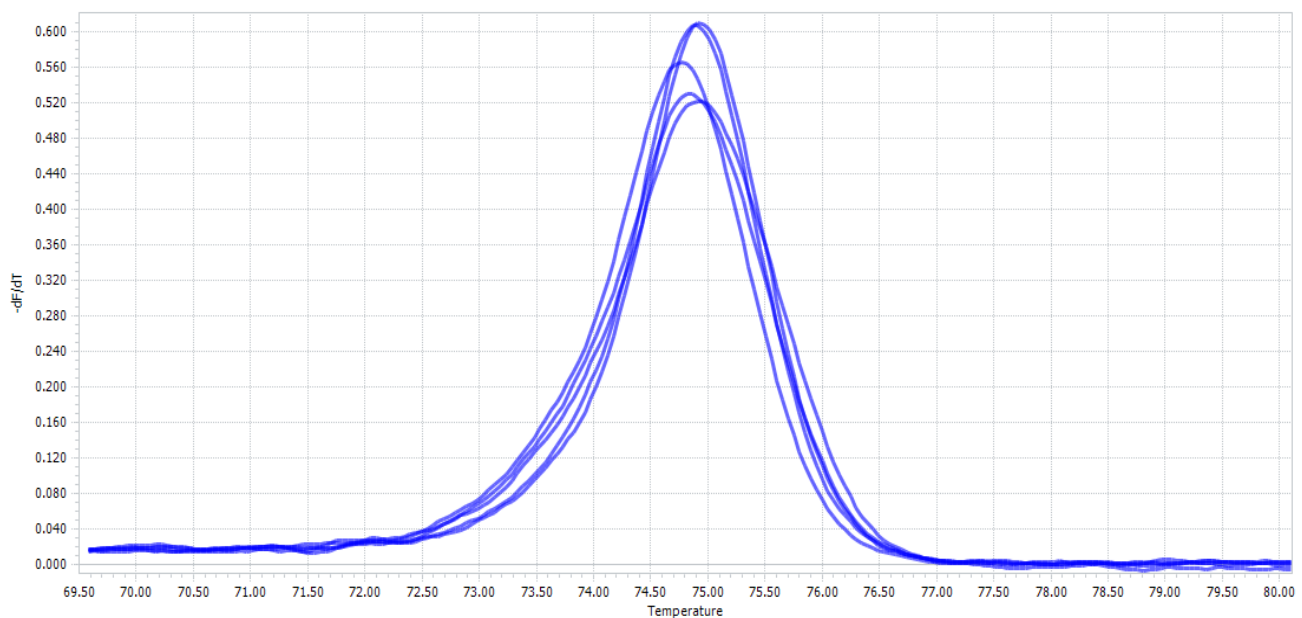


شکل ۱- الکتروفورز cDNA

**نتایج Real-time PCR**

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

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



نمودار ۱- نمودار دمای ذوب

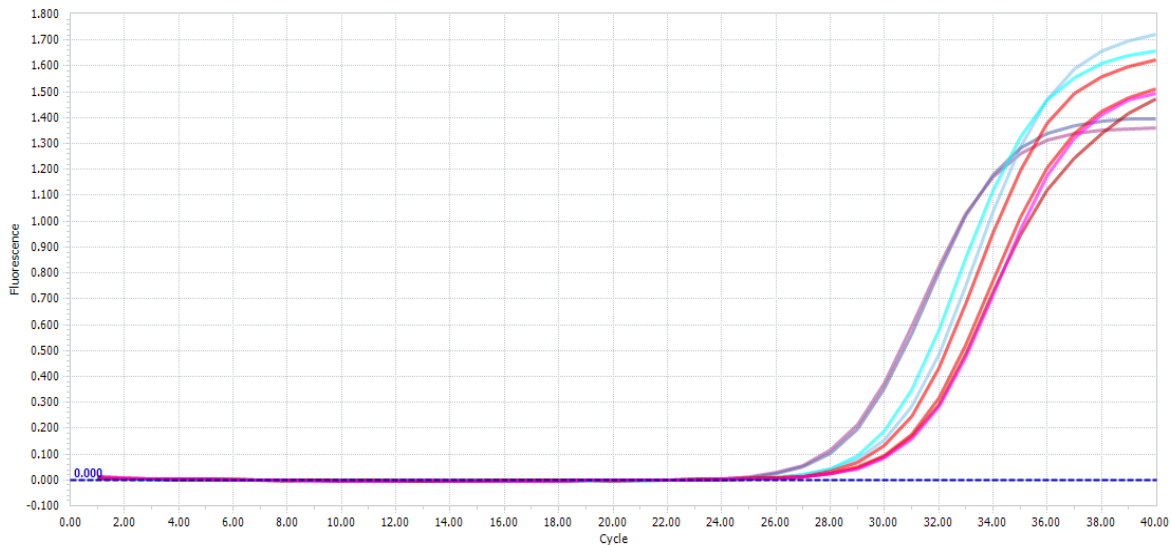


نمونه‌های *E. Coli* بعد از تیمار نانوذره نقره دارای Ct های بیشتر بوده که بیشترین میزان Ct و در نتیجه کمترین میزان بیان هستند. میزان Ct، میزان بیان ژن مقاومت *blaCMY* در نمونه‌های باکتری پس از تیمار با سوپرنانت پروبیوتیک در مقایسه با نمونه باکتری قبل از تیمار به میزان معناداری کاهش یافته است ( $P\text{-value} \leq 0/05$ ) بطوریکه میانگین و انحراف معیار گروه تیمار  $0/35 \pm 0/1$  و گروه کنترل  $1 \pm 0/1$  است.

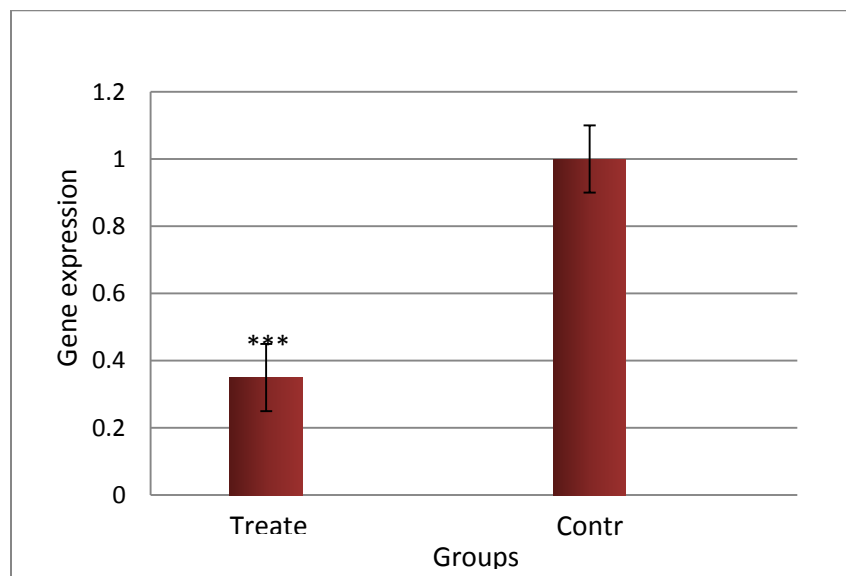
برای اطمینان از اختصاصی بودن قطعه‌های تکثیر شده ژن *blaCMY* مشاهده می‌شود که منحنی ژن مورد سنجش در تمام نمونه‌ها با هم منطبق و به صورت یک قله است (نمودار ۱).

### 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 (سوپرنانت پروبیوتیک) با نمونه کنترل. \*\*\* نشان دهنده سطح معناداری ( $p < 0/001$ )، مقدار  $p$  در این مقایسه  $p = 0$  است.



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 (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 یوروپاتوژن‌ها اثر باکتریوسیدی خود را اعمال کرده است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های اشرشیا کلی بسیار شایع است و این به سبب کسب فاکتورهای مقاومت متعدد است (۱۲). نظر به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در پاتوژن‌های روده‌ای، به نظر می‌رسد اتخاذ یک داروی مناسب برای درمان این عفونت‌ها با مشکل مواجه شده است، بنابراین تعیین الگوی مقاومت دارویی به صورت منطقه‌ای و دوره‌ای برای این باکتری ضروری به نظر می‌رسد. مطابق با مطالعه حاضر، عباسپور و همکاران (۱۳) در سال ۱۳۹۳ نشان دادند که ۲۳/۳ درصد از جدایه‌های شیگالا سونئی به سفتریاکسون و ۲۴/۴ درصد به سفیکسیم، مقاوم بوده‌اند. در آن مطالعه ۳۱/۶ درصد از سویه‌ها MDR بودند و بیشترین میزان مقاومت ۴۰ درصد سویه‌ها مربوط به سفپیم بود. نتایج نشان داد که ارتباط معناداری بین حضور ژن‌های ESBLs و بروز مقاومت به سفالوسپورین‌ها نظیر سفپیم وجود دارد. در مطالعه‌ای که بونت و همکاران در سال ۲۰۰۷ در کشور برزیل انجام دادند، ژن بتالاکتاماز ۲-CMY و AmpC بررسی شدند. مطابق با مطالعه پیش‌رو، در مطالعه بونت و همکاران تمامی سویه‌های دارای مقاومت چندگانه دارای ژن CMY بودند (۱۴). حسینیان و همکاران در تحقیق‌های خود در سال ۲۰۱۱ در پاکستان نشان دادند که فراوانی ژن M-CTX و CMY به ترتیب برابر ۵۷/۷ درصد و ۵۰ درصد بود (۱۵). مندونکا و همکاران در سال ۲۰۰۷ در پرتقال نشان دادند که ۲-M-CTX-bla دارای بیشترین فراوانی در بین سایر ژن‌ها در میان ایزوله‌های جداسازی شده بودند (۱۶).

این اختلاف می‌تواند در نتیجه اختلاف در سال انجام مطالعه، فاصله جغرافیایی، تنوع سویه‌ها و حجم نمونه باشد.

مصرف آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند آموکسی‌سیلین، راه اصلی درمان عفونت‌های باکتریایی است. متأسفانه با افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های قوی‌تر، خطر افزایش بیماری‌های عفونی جان انسان‌ها را تهدید می‌کند. امروزه روش‌های مختلفی به یاری انسان آمده تا مصرف این مقاومت‌ها روز به روز کاهش یابد (۱۷). امروزه محققان به دنبال راه‌هایی برای کاهش مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. پژوهش حاضر با هدف ارزیابی اثر ضد باکتریایی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس در برابر عفونت *E. Coli* مقاوم به سفالوسپورین که حامل ژن *blaCMY* هستند در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

در سال‌های اخیر مطالعه‌های انجام شده تأیید کننده آثار ضد بیماری‌زایی پروبیوتیک‌ها است. به دلیل تولید عامل‌های ضد میکروبی متعدد، پروبیوتیک‌ها به عنوان عوامل درمانی و پیشگیری‌کننده از بیماری‌های عفونی ایجاد شده با پاتوژن‌های دهانی روده‌ای و ادراری-تناسلی مطرح شده‌اند (۱۸). ویژگی مهم باکتری‌های پروبیوتیک توانایی این باکتری‌ها برای مهار افزایش تعداد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و نیز مهار قدرت بیماری‌زایی آنها است. باکتری‌های اسید لاکتیک از قبیل جنس لاکتوباسیلوس با تولید عامل‌های ضد میکروبی و نیز به کارگیری مکانیسم‌های مختلف دارای عملکرد بسیار مؤثری در این راستا هستند (۱۹).

به طور کلی نحوه عملکرد لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی در تداخل با بیماری‌زاهای دستگاه ادراری تناسلی بسیار متنوع است و این تنوع به دلیل چهار ویژگی اصلی این باکتری‌ها از جمله توانایی اتصال، قدرت رقابت و قدرت مهار یوروپاتوژن‌ها است. همچنین باکتری‌های پروبیوتیک با توانایی تجمع سلولی با میکروب‌های بیماری‌زا مجتمع می‌شوند و با آثار ضد اتصال خود مانع از رسیدن و اتصال باکتری‌های پاتوژن به سلول هدف میزبان‌شان می‌شوند (۲۰).

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

## تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه آقای کرار ناصرالرحیمی 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

نویسندگان، تعارض منافی را گزارش نکرده‌اند.

روش ماکروبراث دایلوژن تعیین و به دنبال آن آزمون تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) نیز برای هر یک از نمونه‌ها انجام شد.

MBC و MIC 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 گواهی 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 بتالاکتاماز در سویه‌های *اشرشیا کلی*، مراقبت‌های دقیق 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 بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در این سویه‌ها *blaCMY* است. در نمونه‌های تیمار شده 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

- Sanders ME., Medivitle RW. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *Journal of Nutrition* 2000; 130: 384-390.
- Reid G. & Burton J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection* 2002; 4: 319-324.
- Preliminary Foodnet data on the incidence of food borne illness-selected sites United States, 2002. *MMWR More Mortal Wkly rep*, 2003; P52: 340.
- Saavedra J. Probiotics and infectious diarrhea. *American journal of Gastroenterology*. 2000.;58:1101-1109
- 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.
- Olusoga Ogbolu D, Terry Alli OA, Olanipekun LB, Ojo OI, Makinde O. Faecal carriage of extended-spectrum 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.
- 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.
- Mendonça N, Leitão J, Manageiro V, Ferreira E, Caniça M. Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 Jun;51(6):1946-55
- 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.
- Kuntaman.K, Lestari.E, Juliette 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).
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th ed. CLSI supplement M100S. CLSI, PA. 2018;38-40.
- 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.
- 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.
- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; 48:1-14.
- Hussain M, Hasan F, Shah AA, et al. Prevalence of class A and AmpC beta-lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates from Pakistan Institute of Medical Science, Islamabad, Pakistan. *Jpn J Infect Dis* 2011;64(3):249- 252.
- Mendonça N, Leitão J, Manageiro V, Ferreira E, Caniça M. Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(6):1946-55
- Aitken R.J., Creely K.S. and Tran C.L. Nanoparticles: An occupational hygiene . hygiene review. *Health and safety* 2004;256;13-24
- Servin AL. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 2004; 28 (4): 405- 40.
- 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
- Collado MC., Meriluoto J., Salminen S. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens. *Journal of Microbiological methods* 2007; 71 (1): 71- 4