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

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2023; Vol. 47; No. 4

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.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی- پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی
دوره ۴۷، شماره ۴، سال ۱۴۰۲ شمسی، صفحات ۷۱ تا ۸۱

بررسی اثر پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بر بیان ژن بتالاکتاماز *blaCMY* در جدایه‌های بالینی *اشریشیا کلی* (*Escherichia Coli*)

کرار ناصرالرحیمی، مریم طهرانی‌پور*، محبوبه نخعی‌مقدم

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۶

چکیده

سابقه و هدف: *اشرشیا 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 اشرشیا 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 ($P < ۰/۰۰۱$) . به‌طوری‌که میانگین و انحراف معیار گروه تیمار ۰/۱ ± ۰/۳۵ و گروه کنترل ۰/۱ ± ۱ است.

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

واژگان کلیدی: اشرشیاکلی؛ 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.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]

CC BY NC

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 ارگانیسم‌های 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. 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. بتالاکتامازها، آنزیم‌هایی هستند که سبب مقاومت به سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف، آمینو پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، اکسی ایمونو 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 میکروارگانیسم‌ها 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 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 وCMY 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 آنزیم ها 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 *اشریشیا کلی* در شهر مشهد و نیشابور در بازه زمانی ۹ ماهه (۱۳۹۹-۱۳۹۸ شمسی) است.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]

روش کار

الف)جداسازی و شناسایی جدایه های *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*

در این مطالعه تجربی، تعداد ۶۰ ایزوله *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* از ازمایشگاه 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 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 ائوزین متیلن بلو (EMB) بهره گرفته شد. جهت اثبات سویه های *اشرشیاکلی*، از تست های بیوشیمیایی نظیر اوره آز، سیمون سیترات، Triple Sugar Iron (TSI)، Sulfide Indole Motility (SIM)، 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 CLSI۲۰۱۸ 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 قرارگرفتند. 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، سفتازیدیم، 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 فالکون‌ها به مدت ۲۰ دقیقه و با دور rpm ۷۰۰۰ 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 اسینتو 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 سوپرنانت پروبیوتیک بر باکتری و تعیین کم‌ترین غلظت مهارکنندگی آنها (MIC)، نمونه RNA باکتری استخراج شد. کمترین غلظت مهارکنندگی لاکتوباسیلوس رامنوسوس روی سویه‌های بیماری‌زا *اشریشیاکلی* 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 *پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (۱۰۲۴ تا ۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در ممانعت از رشد ایزوله‌های

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]

اشریشیاکلی بررسی شد. از پودر آنتی‌بیوتیک 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 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 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) مورد سنجش قرار گرفت.

سنتز cDNA

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

Real- time PCR

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

برای تعیین میزان بیان ژن بتالاکتوم *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
blaCMY	Forward: 5′- ATGCACCCATGAGGCTTTCA-3′ Reverse: 5′- GTGTCCAGGCTCCAAATGT-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

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 تیمارشده 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.

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
چرخه۴-۲	۳۵		

آنالیز آماری

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

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]

یافته‌ها

کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی

در این بررسی میزان حساسیت باکتری بیمارزا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج ازجمله آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، جنتامایسین سفتازیدیم، توبرامایسین سیپروفلوکساسین، ایمی پنم، سفپیم، کلیستین، آمپی سلین و سفوتاکسیم 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

دیسک آنتی‌بیوتیک	حساس (درصد)	نیمه حساس (درصد)	مقاوم (درصد)
آمیکاسین (AMP_{10})	۰	۰	٪۶۱
جنتامایسین (GM_{10})	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۴۹(٪۱۰۰)
کلیندامایسین (CC_2)	٪۰	٪۰	(٪۱۰۰)
ایمی پنم (IMp_{10})	۱۳(٪۲۹/۵۳)	۹(٪۲۵/۳۶)	۱۷(٪۲۴/۶۹)
تتراسایکلین (TE_{30})	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۴۹(٪۱۰۰)
سفتازیدیم (CAZ_{30})	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۴۹(٪۱۰۰)
کلرامفنیکل (CH_{30})	۳۱(٪ ۵۳/۲۶)	۷(٪۲۴/۲۸)	۱۱(٪۲۲/۴۴)
سفازولین (CZ_{30})	٪۰	٪۰	٪۱۰۰
سیپروفلوکساسین (CPI5)	٪۰	٪۰	٪۱۰۰
سفتریاکسون (CRX)	٪۰	٪۰	٪۱۰۰
آمپی سیلین (AMP10)	٪۰	٪۰	٪۱۰۰
کلیستین (CO)	٪۰	٪۰	٪۱۰۰
اریترومایسین (E15)	۰ (٪۰)	۰ (٪۰)	۴۹(٪۱۰۰)

در این تحقیق سوپرنانت 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 ایمیپنم مطالعه شد.

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

در این مطالعه کم‌ترین غلظت مهار کننده نانوذره ۰/۰۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر 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.

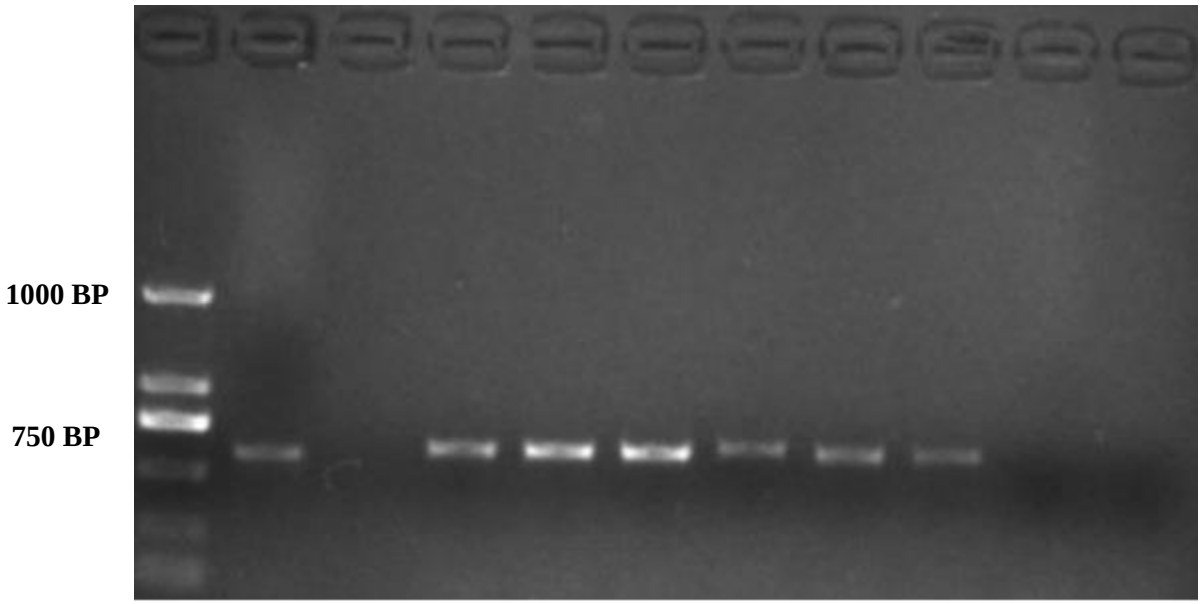
جدول۴- مقادیر نانودراپ نمونه‌ها

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

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]

سنتز cDNA

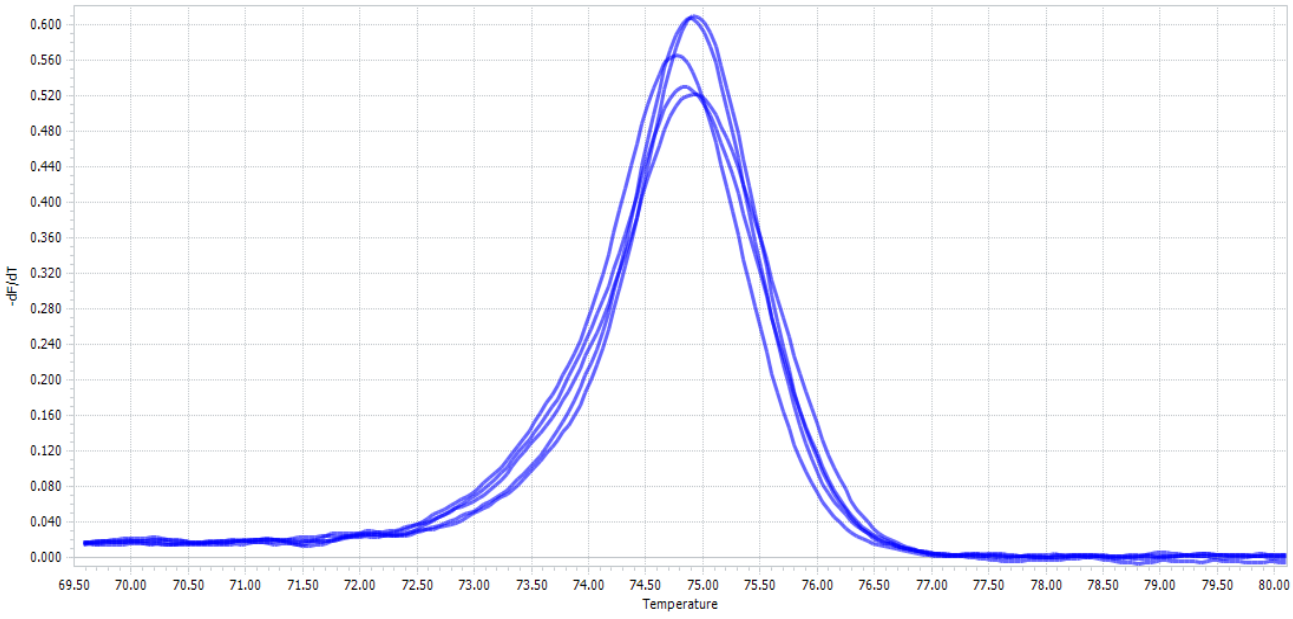
نتایج ژل الکتروفورز پس از سنتز cDNA در شکل ۱ نشان داده شده است. باتوجه به حرکت DNA روی ژل، صحت سنتز cDNA تأیید شد.



شکل ۱- الکتروفورز cDNA

نتایج Real- time PCR

پس از آنالیز داده‌های ΔCT نمونه‌های تست و کنترل، میزان آن در هر باکتری مشخص شد و درنهایت مقدار ΔΔCT نیز به دست آمد که با توجه به منفی بودن اعداد به دست آمده، در نتیجه کاهش بیان ژن در آنها به اثبات رسید.



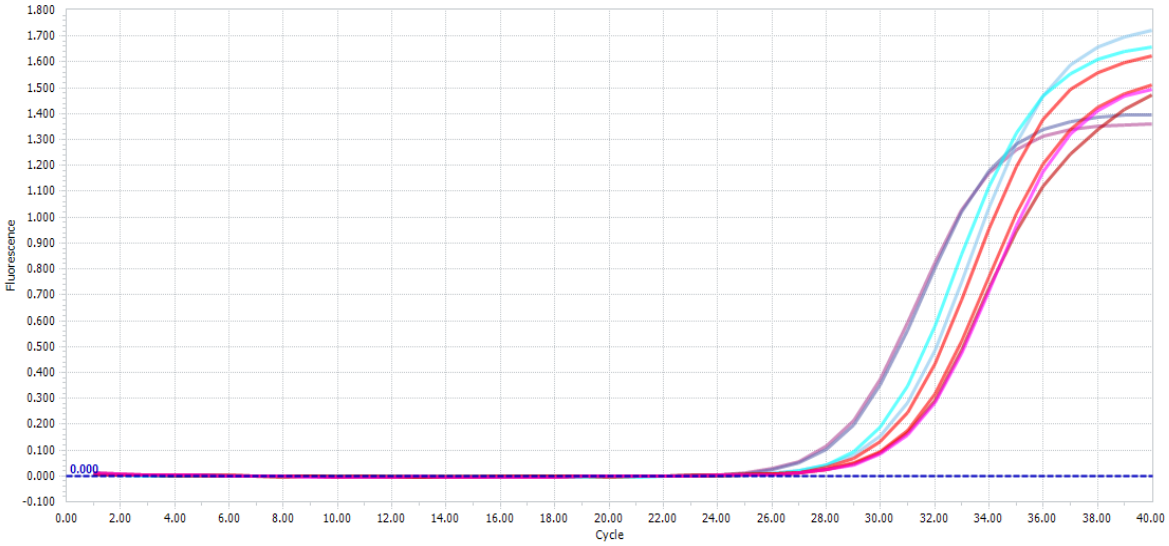
نمودار ۱- نمودار دمای ذوب

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]

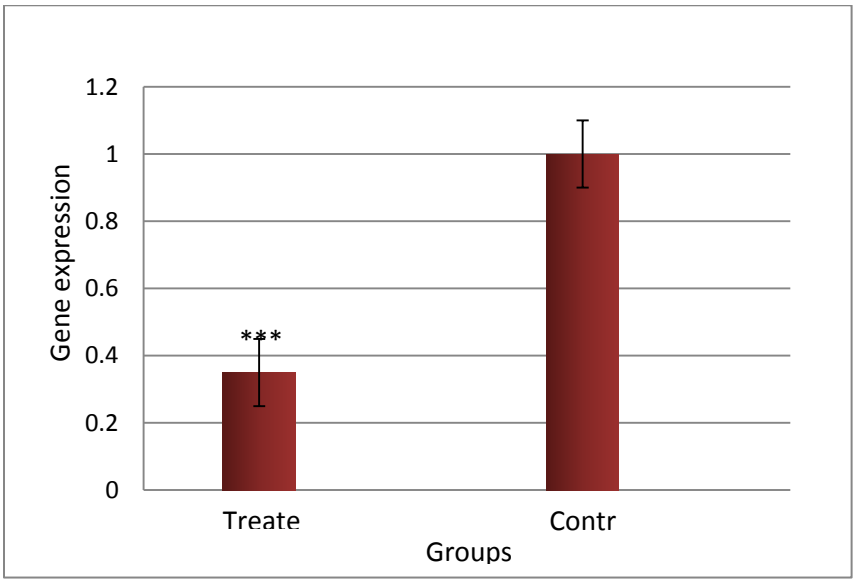
برای اطمینان از اختصاصی بودن قطعه‌های تکثیر شده ژن *blaCMY* مشاهده می‌شود که منحنی ژن مورد سنجش در تمام نمونه‌ها با هم منطبق و به صورت یک قله است (نمودار ۱).

منحنی تکثیر دستگاه Real- time PCR

همان‌طور که در مورد نمودار ۳ ذکرشد، ژن‌هایی که دارای Ct کمتری هستند درنتیجه 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 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-value ≤ ۰/۰۵) بطوریکه میانگین و انحراف معیار گروه تیمار ۰/۱ ± ۰/۳۵ و گروه کنترل ۰/۱ ± ۱ است.



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



نمودار ۳- میزان بیان ژن *blaCMY* درنمونه‌های تحت تیمار با (سوپرنانت پروبیوتیک) با نمونه کنترل.

***** نشان دهنده سطح معناداری (p < ۰/۰۰۱)، مقدار p در این مقایسه ۰ = p است.**

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]

بحث

یافته‌ها نشان داد که بیان ژن در نمونه‌های تیمارشده با عصاره پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس به طرز معناداری نسبت به نمونه‌های کنترل کاهش یافته است (۰/۰۰۱) به طوری‌که میانگین و انحراف معیار گروه تیمار ۰/۱ ± ۰/۳۵ و گروه کنترل ۰/۱ ± ۱ 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 جدایه های 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 CMY-۲ 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 blaCTX- M-۲ 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 آنتی بیوتیک هایی 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 ا 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 سال ای 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 اتصالی خود مانع از رسیدن و اتصال باکتری‌های پاتوژن به سلول هدف میزبان‌شان می‌شوند (۲۰).

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

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]

روش ماکروبراث دایلوشن تعیین و به دنبال آن آزمون تعیین حداقل غلظت کشندگی (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 ($P < ۰/۰۰۱$) کاهش داده است (نمودار ۴-۳).

پیشنهاد می‌شود با توجه به شیوع بالای ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام 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 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.

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

نویسندگان، تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]

References

1. Sanders ME., Medivitle 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. Premliminary Foodnet data on the incidence of food borme illness-selected sites United States, 2002. MMWR More Mortal Wkly rep, 2003; P52: 340.

4. Saavedra J. Probiotics and infectious diarrhea.American journal of Gastronterology.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 Escerichia 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 Jun;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 Chemother2004: 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

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-11-21]