بررسی مولکولی اثر پروبیوتیک بر ژن *IutA* در سویه‌های مختلف *E.coli* جدا شده از عفونت ادراری

مونا محمد علیها[۱]، **دکتر رودابه بهزادی اندوهجردی[۲]***

[۱]گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی،تهران، ایران.

[۲] گروه ژنتیک ،واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی،تهران ،ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۹

چکیده

عفونت دستگاه ادراری ناشی از اشریشیاکلی، یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در ایران است. وجود ژن ویرولانس *iutA* در اشریشیاکلی عامل مهم پاتوژنیسیته و به‌ویژه اتصال این ارگانیسم به سلول‌های اپی‌تلیال می‌باشد. لاکتوباسیلوس‌ها به عنوان دسته‌ای از پروبیوتیک‌ها نقش مهمی در بدن دارند و در برخی موارد به دلیل اثرات درمانی مفید هستند. هدف از این مطالعه بررسی مولکولی فعالیت *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC1608 بر روی انواع سویه‌های اشرشیاکلی پاتوژن جداسازی شده با روش PCR از عفونت‌های ادراری می‌باشد. در این مطالعه، سویه اشرشیاکلی پاتوژن از نمونه بیماران مبتلا به عفونت ادراری جدا شد و با روش PCR بررسی شد. سپس، گونه‌های با ژنوتایپ‌های مثبت، جداسازی شده و اثر ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس کازئی* به روش انتشار دیسک و رقت‌سازی در محیط مایع، بررسی شد. اثر ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس کازئی* روی باکتری اشرشیاکلی جداسازی شده از نمونه ادرار ۴۰ نفر از بیماران مبتلا به عفونت ادراری بررسی شد. همچنین، نتایج تست آنتی‌بیوتیکی از رقت ۱ تا ۱۰ به‌صورت هاله عدم رشد با ابعاد ۹ mm مشاهده شد. این نتایج نشان داد که باکتری جدا شده به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین مقاوم نشده و درمان آنتی‌بیوتیکی در مورد این سویه نتیجه بخش است. همچنین پروبیوتیک به‌کار رفته، دارای نقش درمانی بوده و باعث بهبود عفونت ادراری می‌شود.

واژگان کلیدی: آمپی‌سیلین، اشرشیاکلی (E.coli)، پروبیوتیک، ژن ویرولانس *iutA*، عفونت دستگاه ادراری، *لاکتوباسیلوس کازئی*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، یوروپاتوژنیک

* roudabeh behzadi@iauctb.ac.ir

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

مقدمه

اشرشیاکلی[1] به طور اختصار *E.coli*، نوعی باکتری گرم منفی غیرهوازی از خانواده انتروباکتریاسه است که به طور شایع در جانوران خونگرم و خونسرد وجود دارد. بیشتر سویه‌های اشرشیاکلی بی‌ضرر هستند (۱). باکتری اشرشیاکلی بخشی از فلور طبیعی روده است، این‌گونه باکتری، ۰/۱ ٪ فلور روده را به خود اختصاص داده است (۲) و از استقرار باکتری‌های انتروباکتریاسه[2] و برخی دیگر از باکتری‌های پروتئولیتیک در روده جلوگیری می‌کنند. اما برخی از سروتیپ‌ها مانند O157: H7 موجب مسمومیت غذایی و اسهال می‌شوند. اشرشیاکلی مهم‌ترین عامل عفونت دستگاه ادراری می‌باشد که حدود ۹۰٪ عفونت‌های ادراری در زنان جوان را به خود اختصاص می‌دهد (۳).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از جدی‌ترین مشکلات بهداشت عمومی در سراسر جهان است. گزارش‌ها حاکی از آن است که انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب جهت درمان عفونت‌های دستگاه ادراری باید بر اساس الگوی مقاومت در مناطق جغرافیای مختلف، دردسترس‌بودن دارو و سابقه عدم آلرژی بیماران انجام شود. باکتری‌های مورد بررسی در این مطالعه جزو خانواده انتروباکتریاسه می‌باشند (۴).

باتوجه‌به مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا در مقابل داروهای آنتی‌بیوتیکی یکی از راه‌های درمانی و غلبه بر مساله مقاومت آنتی‌بیوتیکی، استفاده از سایر روش‌های درمانی و به‌کارگیری مواد طبیعی از جمله باکتری‌های پروبیوتیک برای درمان آن‌ها است (۵). در این حوزه، فعالیت پروبیوتیک گونه‌های باکتری به‌ویژه در عفونت ادراری مورد بررسی و پژوهش قرار نگرفته است و استفاده از میکروارگانیسم‌های زنده (پروبیوتیک) جایگزینی امیدوارکننده برای پیشگیری و درمان عفونت‌های مکرر دستگاه ادراری است (۶).

به‌طورکلی اولین راه برای مبارزه با عفونت‌های دستگاه ادراری به‌ویژه عفونت‌های ناشی از *اشرشیاکلی اوروپاتوژن* درمان با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها است. اما امروزه ثابت شده است که به دلیل تشکیل بیوفیلم و همچنین ظهور مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری‌ها، استفاده از درمان آنتی بیوتیکی با محدودیت روبرو شده است و پژوهش‌های زیادی برای یافتن راه‌های جایگزین درمان انجام شده‌اند. یکی از مسیرهای درمانی جایگزین، آنتی‌ادهسین تراپی است که روشی برای سدکردن اتصال باکتری و جلوگیری از تشکیل بیوفیلم باکتریایی است.

از دیگر روش‌های آزموده شده در این زمینه و در چند دهه اخیر، استفاده از میکروارگانیسم‌های کومنسال یا سودمند مانند لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی برای رقابت و جلوگیری از اتصال باکتری‌های بیماری‌زا است (۷-۸). باکتری‌های پروبیوتیک مانند لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی در اتصال به سطوح اپی‌تلیال با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا رقابت می‌کنند و دارای توانایی اتصال اختصاصی و غیراختصاصی برای جایگاه‌های هدف می‌باشند. اتصال اختصاصی زمانی انجام می‌شود که یک ادهسین (عامل چسبنده) سطح سلول باکتری به یک گیرنده سطح سلول اپی تلیال میزبان متصل شود که در اصطلاح این عملکرد قفل-کلید نامیده می‌شود. اتصال غیراختصاصی باکتری‌های پروبیوتیکی پدیده متداول‌تری است که به‌واسطهٔ نیروی آب‌گریزی یا الکترواستاتیک انجام می‌شود. اگرچه اتصال غیراختصاصی ممکن است برای استقرار بر روی سلول‌های اپی‌تلیال در شرایط درون‌تن کافی نباشد، اما احتمالاً در جذب سوبسترا و در نتیجه افزایش رشد مؤثر است (۹-۱۰). به‌طورکلی نحوه عملکرد لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی در تداخل با بیماری‌زاهای دستگاه ادراری تناسلی بسیار متنوع است و این تنوع به علت چهار ویژگی اصلی این باکتری‌ها از جمله توانایی اتصال، قدرت رقابت و قدرت مهار یورو پاتوژن‌ها است (۱۱). اثر ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس کازئی* در مقایسه با لاکتوباسیلوس‌های دیگر در حالتی که از سوپرناتانت پروبیوتیک استفاده می‌شود نیز بیشتر بوده و *لاکتوباسیلوس کازئی* دارای تجمع‌پذیری بیشتری با یوروپاتوژنیک بوده است (۱۲).

[1] *Escherichia coli*

[2] Enterobacteriaceae

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

از آنجایی که میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا برای ایجاد بیماری ابتدا باید به سطوح متصل شوند و سپس از طریق فاکتورهای بیماری‌زایی خود منجر به بروز بیماری شوند، این نقش باکتری‌های پروبیوتیک یکی از راهکارهای مبارزه با باکتری‌های بیماری‌زا است (۱۰-۱۳). یکی از نکات موردتوجه در امر درمان بیماری‌های عفونی انجام تعیین مقاومت پادزیستی است که باید پیش از شروع درمان انجام شود. همچنین، باید از مصرف بی‌رویه پادزیست پرهیز شود تا علاوه بر درمان مؤثر مانع از پیدایش سویه‌های مقاوم شود (۱۴). با توجه به طیف وسیع باکتری‌ها، یکی از دغدغه‌های بیولوژیست‌ها و میکروبیولوژیست‌ها یافتن انواع مفید و بی ضرر باکتری‌ها و نیز شناسایی انواع بیماری‌زای آنها است. در این پژوهش بررسی میزان بیماری‌زا بودن باکتری اشرشیاکلی با استفاده از ژن موردنظر (*IutA*) انجام شده است (۲) و هدف اصلی در این پژوهش دستیابی به درمان عفونت‌های ادراری ناشی از *E.coli* و گونه‌های مقاوم آن به آنتی‌بیوتیک‌ها است (۱۵). باتوجه‌به وجود گونه‌های مختلف غیر بیماری‌زا و بیماری‌زای اشرشیاکلی در جانوران به‌ویژه در انسان، تحقیقات زیادی توسط محققان حوزه پزشکی و دارویی در مورد این باکتری انجام شده است و یافتن نوع مفید و بی‌ضرر و شناسایی نوع بیماری‌زا و مضر آن‌یکی از دغدغه‌های اصلی دانشمندان در سال‌های اخیر می‌باشد و با روش‌های مختلف تشخیص و شناسایی بیولوژی گونه‌های مختلف بررسی شده است (۱۵-۱۶). تحقیقات گسترده‌ای در یافتن تمایز گونه‌های این باکتری و نوع فعالیت آن‌ها انجام شده است، اما بررسی فعالیت پروبیوتیک گونه‌های مختلف باکتری در درمان عفونت‌ها به‌ویژه عفونت ادراری کمتر مورد بررسی و پژوهش قرار گرفته است (۱۵). با توجه به گستره وسیع این باکتری در این زمینه به بررسی مولکولی فعالیت پروبیوتیک بر روی سویه پاتوژن جداشده با روش PCR از عفونت‌های ادراری و کشت سلولی پرداخته شده است (۳). با توجه به مطالب بیان شده با دستیابی به این هدف می‌توان به درمان عفونت‌های ادراری ناشی از اشرشیاکلی و گونه‌های مقاوم آن به آنتی‌بیوتیک‌ها امیدوار شد. یکی از دغدغه‌ها و نگرانی‌ها در علوم زیستی و پزشکی، مقاومت باکتریایی و قارچی است تا جایی است که افزایش مقاومت‌های ناشی از استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی که میزان مقاومت برخی از این باکتری‌ها به داروهای شیمیایی بیش از ۹۰ ٪ است. ژن *IutA* در غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی از جمله اشرشیاکلی قرار دارند و سبب انباشت و اتصال آن‌ها به گیرنده‌های پروتئینی پری‌پلاسمایی می‌شوند (۱۷). آنالیز فراوانی ژن *IutA* در این مطالعه در جدایه‌های اشرشیاکلی بیماری‌زای دستگاه ادراری (UPEC) قرار دارد و در UPEC بالاترین فراوانی را در ژن *IutA* دارد. به همین منظور از این ژن برای بررسی بیماری‌زای دستگاه ادراری استفاده شده است (۱۸). هدف از این پژوهش بررسی اثر پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* بر روی ژن *IutA* در سویه‌ی موردنظر اشرشیاکلی با به‌کارگیری روش‌های مختلف بوده است.

مواد و روش‌ها

مطالعه تجربی حاضر دارای کد اخلاق به شماره IR.IAU.CTB.REC.1401.017 می‌باشد.

جمع‌آوری نمونه

برای مطالعه حاضر، ۴۰ نمونهٔ ادراری از بخش میکروبیولوژی آزمایشگاه بیمارستان ناجا امام سجاد (ع) جمع‌آوری شد. سویه‌ی میکروبی اشرشیاکلی مورداستفاده از مرکز انستیتو پاستور با شماره ATCC 25922 تهیه شد و به عنوان کنترل مثبت ژن *IutA* استفاده شد (۱۹)

همچنین، سویه *لاکتوباسیلوس کازئی*[1] با شماره ATCC 39392 از مرکز کلکسیون و میکروارگانیسم ایران تهیه شد. سپس، کلنی‌های باکتریایی جمع‌آوری‌شده از نظر ویژگی‌های فنوتیپی کلنی (رنگ کلنی، شکل کلنی و...) ارزیابی شدند و باسیل‌های گرم منفی با کلنی‌های صورتی رنگ در محیط کشت مکانکی آگار (باکتری‌های غیرتخمیری در این محیط بی‌رنگ هستند) و نیز کلنی‌های با جلای فلزی[2] در محیط EMB، به‌عنوان سویه‌های *اشرشیاکلی*

[1] *Lactobacillus casei*

[2] Methalic Sheen

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

یوروپاتوژن[1] انتخاب شدند. برای حصول اطمینان از صحت انتخاب کلنی‌ها، تست‌های بیوشیمیایی ذیل در مورد هر یک از کلنی‌های موردنظر به‌صورت جداگانه انجام شدند:

۱.کشت کلنی‌ها در محیط TSI برای تست باکتری از نظر تخمیر قندها (گلوکز، لاکتوز، سوکروز)، تولید H2S و تولید گاز

۲.تست مصرف سیترات در محیط سیمون سیترات

۳.تست تحرک باکتری(Motility) در محیط SIM

۴.تست اندول با استفاده از معرف کواکس

۵.تست متیل رد (MR) و تست ووگز-پروسکوئر(VP)

۶.تست اوره آز

در نهایت تعداد ۴۰ ایزولهٔ یوروپاتوژن *E. coli* که واکنش مربوط به آن‌ها در مورد هر یک از تست‌های مذکور به شرح جدول ۱ بود، به‌عنوان سوش‌های یوروپاتوژن *E. coli* انتخاب شدند. در تمامی نمونه‌ها حضور *اشرشیاکلی یوروپاتوژن* با تست‌های افتراقی تأیید شد و این نمونه‌ها برای انجام تحقیقات بعدی نگهداری شدند. برای نگهداری ایزوله‌های بالینی *E. coli* ابتدا مقادیر مناسب و کافی از کلنی‌های باکتریایی در کنار شعله و با استفاده از آنس استریل برداشته شد. سپس، این کلنی‌ها در محیط نگهدارنده TSB، تلقیح شدند. این محیط ها می‌توانند رشد سوش‌ها را به مدت طولانی تأمین کنند. پس از تلقیح باکتری، ۱۵٪ گلیسرول به محیط اضافه شد و نمونه‌ها به فریزر ۷۰ °C- انتقال داده شدند. نمونه ادراری روی محیط کشت EMB (آگار) کشت خطی داده شدند و در لوله‌های افتراقی ریخته شدند تا با بررسی جلای فلزی به وجود *E. coli* پی برده شود. سپس، از نمونه‌ها (۴۰ عدد) روی پلیت‌ها، کشت خطی داده شد. پس از کشت، نمونه‌ها به انکوباتور منتقل شد و ۲۴ h زمان برای تشکیل کلنی‌ها داده شد. نمونه‌ها پس از ۲۴ h از انکوباتور خارج شدند و به یخچال غیر استریل منتقل شدند. در ادامه کار، محیط‌کشت مایع ساخته شد و کلنی‌های تشکیل شده روی محیط‌کشت جامد در محیط کشت مایع هینتون براث کشت داده شد. ابتدا ۳/۳۹ gr محیط کشت هینتون براث به‌عنوان محیط کشت مغذی وزن شد و در ۳۰ cc آب مقطر حل شد. مقدار ۵ cc از این محلول در فالکون ۱۵ ریخته شد و گرم‌خانه‌گذاری شد. پس از ۲۴ h به شیک انکواتور منتقل و ۲۴ h نیز در آنجا گرم‌خانه‌گذاری شد. در مرحلهٔ بعد استخراج DNA انجام شد است.

پرایمر مورداستفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

در مطالعه حاضر ژن *IutA* بررسی شده است (۲۱). ابتدا DNA نمونه‌ها با استفاده از روش جوشاندن (Boiling) استخراج شد (۲۰) و سپس، برای شناسایی این ژن پرایمر اختصاصی طراحی شد. طراحی پرایمر نامناسب می‌تواند منجر به عدم تکثیر قطعه موردنظر در PCR، تولید کم محصول PCR و یا از سوی دیگر منجر به تولید غیراختصاصی محصولات PCR شود. در این پژوهش برای طراحی پرایمر ابتدا توالی ژن موردمطالعه به فرمت FASTA از بانک‌های توالی اسیدنوکلئیک به‌دست آمد. تمامی پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار Gene runner طراحی شده است. برای تخصیص‌دادن پرایمرهای طراحی شده، توالی فوق در پایگاه اطلاعاتی NCBI، BLAST ، بررسی شده و میزان همپوشانی و واکنش متقاطع سایر ژن‌ها و ارگانیسم‌ها بررسی شد. مشخصات پرایمر اختصاصی مورداستفاده PCR در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۱. تست‌های تشخیصی باکتری

تست TSI	اسید/اسید
تولید گاز	+/--
H2S	--
مصرف سیترات	--
تحرک باکتری	+/--
اندول	+
متیل رد	+
وژز پروسکوئر	-
اوره آز	-

[1] *Escherichia coli europathogenI*

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

جدول ۲.مشخصات پرایمرهای مورداستفاده در PCR

نام پرایمر	توالی ('۵ به '۳)		اندازه (bp)
IutA	F:GGCTGGACATCATGGGAACTGG	MK111112.1	۳۰۲ (bp)
	R: :CGTCGGGAACGGGTAGAATCG		
	R: :CGTCGGGAACGGGTAGAATCG		

جدول ۳. برنامه دمایی استفاده شده برای انجام واکنش PCR

مراحل	دما (°C)	زمان	تعداد تکرار
Primary Denaturation	۹۵	۱۰ min	۱
Denaturation	۹۵	۴۵ s	۴۰
Annealing	۵۸	۵۲ s	
Extension	۷۲	۲۵ s	
Final Extension	۷۲	۱۰ min	۱

ترکیب مواد و برنامه حرارتی مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با حجم نهایی ۲۵ µl حاوی ۱۲/۵ µl مسترمیکس، ۰/۵ µl فوروارد، ۰/۵ µl ریورس، ۲ µl از نمونه ژنوم DNA و ۹/۵ µl آب مقطر استریل انجام شد.

لازم به ذکر است که در هر سری از تست‌های PCR، نمونه‌های موردنظر به‌علاوه کنترل مثبت و کنترل منفی (جهت اطمینان از نبود آلودگی در تست) به همراه نمونه‌های مجهول PCR داده شد است، سپس با استفاده از دستگاه ترموسایکلر[1] برنامه دمایی شامل دناتوراسیون اولیه ۱۰ min در دمای ۹۵ °C، دناتوراسیون ۴۵ s در دمای ۹۵ °C، اتصال پرایمر اختصاصی ژن *papG* به‌مدت ۵۲ s در دمای ۵۸ °C برای ۴۰ سیکل و تکثیر نهایی به‌مدت ۲۵ s در دمای ۷۲ °C انجام شد (جدول ۳). در ادامه محصول حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی آگارز ۱٪ الکتروفورز شد (چاهک ۲ کنترل منفی)، (چاهک ۳ کنترل مثبت) و با استفاده از دستگاه ژل داک بررسی شد.

استخراج سوپرناتانت

جدایه *لاکتوباسیلوس کازئی* را باتوجه‌به شرایط رشد اختصاصی خود کشت داده شده و سوپرناتانت آن استخراج شد. برای اطمینان از عدم حضور باکتری در سوپرناتانت، از فیلتر سر سرنگی ۰/۲۴ µl استفاده شد و سوپرناتانت از این فیلتر عبور داده شد. در ابتدا از باکتری‌های موردنظر (دوبار مثبت[2] و دوبار منفی[3]) در محیط کشت مولر هینتون براث کشت تازه تهیه شد. سپس مقداری از هر باکتری در سرم فیزیولوژی استریل حل شد.

آنتی‌بیوگرام

برای به‌دست آوردن سویه باکتریایی *E.coli* و تأیید سویه موردنظر، اشرشیاکلی پاتوژن از بیماران مبتلا به عفونت ادراری جداسازی شد و برای آنها رنگ‌آمیزی گرم انجام شد. این سویه پس از تأیید، برای تهیه سوسپانسیون سلولی جهت تست[4] MIC استفاده شد.

[1] Thermocycler
[2] Double Positive
[3] Double Negative
[4] Minimum Inihibitory Concent

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

برای میـزان تأثیر مسـتقیم پروبیوتیـک، ازمایع رویی کشت سلولی لاکتوباسیلوس استفاده شد. سویه‌ی بالینی *لاکتوباسیلوس کازئی* از مرکز کلکسیون و میکروارگانیسم ایران تهیه شـد. بـرای انجام تست MIC از محیط مـولر هینتـون بـراث استفاده شد. سوسپانسـیونی از بـاکتری بـه میـزان اسـتاندارد معادل نیم مک فارلند تهیه شد کـه در ایـن سوسپانسـیون معادل $1/5 \times 10^8$ cfu/ml باکتری طبق جـدول اسـتاندارد موجود می‌باشد.

تست MIC برای تأثیر کشندگی باکتری پروبیوتیک بر روی سویه‌ی موردنظر *E. coli* به روش میکروپلیت در حضور رقت‌های مختلف از باکتری پروبیوتیک (به‌عنوان پادزیست) انجام شد (۲۲). رقت‌های مختلف که شامل (۲۵٪، ۲۰٪، ۱۵٪، ۱۲/۵٪ و ۱۰٪) به‌صورت سریالی از پادزیست (سـویه پروبیوتیک) در محـیط مولر هینتـون بـراث در حجم ۱ µl تهیه شد و در انتها به هر یک از نمونه‌ها حجمی از باکتری موجود در سرم فیزیولوژی اضافه شد که میزان باکتری‌ها در آن برابر با 10^5 µl بود و سپس به‌مدت ۲۴ h در دمای ۳۷ °C در داخل انکوباتور قرار گرفت. پس از گذشت این زمان، کدورت‌های حاصل از رشد باکتری درون چاهک‌ها مشاهده شد و رقت‌های MIC خوانده شد. با مشاهدهٔ ایجاد کدورت در هر چاهک، چاهک قبلی به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد.

برای کنترل کیفی نمونه‌ها ابتدا یک گروه کنترل مثبت (محیط کشت به همراه باکتری) و یک گروه کنترل منفی (محیط کشت و ماده مورد تست) در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ h کدورت باکتری‌ها بررسی شده است.

اصطلاح MBC، در مورد دارو حداقل غلظت از بین برنده باکتری است . در این مرحله، حساسیت میکروبی هر یک از ایزوله‌های بالینی اشرشیاکلی نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ارزیابی شد. پس از تهیه سوپرناتانت کشت ۴۸ ساعته باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی*، ۴۰ µl از سوپرناتانت با رقت‌های ۱، ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ به دیسک‌های مخصوص آنتی‌بیوگرام خالی اضافه شد.

در روش دیسک دیفیوژن ابتدا یک سوسپانسـیون اولیه از باکتری پروبیوتیک در محیط مولر هینتون بـراث بـا غلظت ۴ µg، معادل ۰/۱ مک فارلند تهیه شد. سپس با سوآپ استریل به‌صورت انبوه کشت داده شد.

در این پژوهش از دیسک آنتی‌بیوتیکی آمپی‌سیلین به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. دلیل انتخاب این دیسک آنتی‌بیوتیکی، وسیع‌الطیف بودن و قابل‌دسترس بودن آن و همچنین استفاده رایج این آنتی‌بیوتیک سبب انتخاب این دیسک شده است. دیسک‌های آغشته به نمونه مورد آزمایش و آمپی‌سیلین با فاصله‌های مناسب در محیط آگار قرار داده شدند و به مدت ۲۴ h در انکوباتور در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند. قطر هاله عدم رشد توسط خط کش اندازه‌گیری شد.

برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، وجود و یا عدم وجود ژن‌های موردنظر در نمونه‌های *اشرشیاکلی* جدا شده از مبتلایان به عفونت ادراری مراجعه‌کننده به آزمایشگاه بیمارستان امام سجاد (ع) ناجا بخش میکروبیولوژی و اثر پروبیوتیک بر روی باکتری‌های ایزوله شده، از آزمون‌های آماری استفاده شد. برای ارزیابی‌های آماری از test-t نرم افزار Prism Graphpad نسخه ۶ استفاده شد و تمامی داده ها به‌صورت دوبه‌دو با یکدیگر مقایسه شدند. در سویه بالینی و سویه استاندارد اشرشیاکلی، قطر هاله عدم رشد معنی داری در حضور پادزیست (باکتری پروبیوتیک) نسبت به عدم حضور پادزیست مشاهده شد. این موضوع در حالی است که تفاوت معنی‌داری در میان تمامی سویه‌های بالینی در مقایسه با سویه استاندارد مشاهده نشد و این تفاوت تنها در میان چندسویه بالینی نسبت به گروه استاندارد مشاهده شد که این موضوع می تواند با تفاوت‌های میان سویه های بالینی در برخی از ویژگی‌ها مرتبط باشد.

نتایج

از اسفند ۱۳۹۹ سال ۱۴۰۰ تعداد ۴۰ ایزوله مورد بررسی قرار گرفته و از این تعداد، ۴۰ ایزوله *اشرشیاکلی* با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی جدا شده است. نمونه‌گیری مستمر در طی چند ماه از آزمایشگاه بیمارستان امام سجاد (ع) ناجا بخش میکروبیولوژی، بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری مراجعه‌کننده انجام شده است (جدول ۴).

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

شناسایی باکتری

در این پژوهش از آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای شناسایی حضور ژن‌های موردنظر استفاده شده است. همچنین، از روش کشت سلولی نیز برای تأیید نتایج استفاده شده است. توالی و مشخصات پرایمرها موردنظر با استفاده از مقالات و متون علمی به‌دست‌آمده است و از آن‌ها در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شده است. توالی موردنظر با کمک دستگاه PCR و با برنامه دمایی مناسب تکثیر شد. سپس، با روش الکتروفورز و ژل آگار به شناسایی آن‌ها پرداخته شده است. در موارد مورد نیاز، از اطلاعات بانک ژنی NCBI نیز استفاده شده است.

جدول ٤. اطلاعات مرتبط با بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه‌کننده به آزمایشگاه

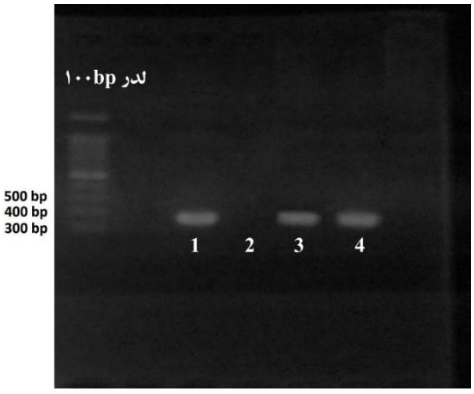
جنسیت	مرد	٪ ۲۳
	زن	٪ ۷۷
وضعیت بیماران	مراجعه‌کننده دارای بیماری	٪ ۷۱
	مراجعه‌کننده بدون علائم بیماری	٪ ۲۹
سن بیماران	زیر ۴۰ سال	٪ ۳۷
	بالای ۴۰ سال	٪ ۶۳

نتایج آزمایش‌های مولکولی

وجود ژن *IutA* در سویه‌های اشرشیاکلی با تکنیک PCR بررسی شد(شکل ۱). سوش استاندارد *E.coli* ATCC25922 به‌عنوان کنترل مثبت درنظر گرفته شده است. مطابق نتایج PCR از ۴۰ سویه اشرشیاکلی ایزوله شده، ۸ سویه پس از PCR ژن *IutA*، در ژل آگارز باند واضح نشان دادند.

نتایج آزمون کشت باکتری‌های پروبیوتیک

در آزمون کشت کامل باکتری‌های پروبیوتیک، میانگین قطر هاله عدم رشد اشرشیاکلی یوروپاتوژن توسط *لاکتوباسیلوس کازئی* mm ۹ بود، اما بر روی شاهد mm ۱۹ گزارش شد.



شکل ۱. نتایج PCR. ستون: لدر(۱۰۰ جفت باز)، چاهک۱، نمونه مثبت برای ژن IutA؛ چاهک ۲، نمونه کنترل منفی؛ چاهک۳، نمونه مثبت برای ژن IutA؛ چاهک٤، نمونه کنترل مثبت

همچنین، اثر ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس کازئی* بر روی اشرشیاکلی یورو پاتوژن در حالت کشت کامل باکتری‌های پروبیوتیک، به‌مراتب کمتر از حالت مشابه در آنتی‌بیوگرام‌ها بوده است. در آزمون بررسی اثر ضدمیکروبی سوپرناتانت، بررسی کدورت لوله‌ها در نمونه‌های یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی نشان داده است که میانگین حداقل غلظت مهارکننده رشد سوپرناتانت لاکتوباسیلوس کمتر از ۹ است. اما این مقدار بر روی شاهد بیشتر از ۱۹ است. بررسی نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده است که در روش انتشار دیسک، اثر ضدمیکروبی پروبیوتیک‌ها در سطح معناداری به رقت وابسته است. در رقت‌های بالاتر باکتری پروبیوتیک، قطر هاله عدم رشد کوچک‌تر شده است (جدول۵).

نتایج تست‌های MBC-MIC

تست MIC-MBC شامل رقت‌های مختلفی از سوپرناتانت (۲۵٪، ۲۰٪، ۱۵٪، ۱۲/۵٪ و ۱۰٪) تهیه شده از باکتری پروبیوتیک بود. در این تست به‌صورت مستقیم از این رقت‌ها استفاده شد و سویه *لاکتوباسیلوس کازئی* تهیه شده با غلظت معادل نیم مک فارلند بعد از حدود h ۲۴ انکوباسیون بررسی شدند(جدول ۶).

نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی

گزارش تست دیسک دیفیوژن

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

همان‌طورکه در شکل ۲ مشاهده می‌شود بررسی اثر مهاری دیسک آنتی‌بیوتیک با غلظت ۴ µg بر روی ۵ نمونه جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری، صورت گرفته است. هاله عدم رشد ایجاد شده به‌صورت جداگانه مورد بررسی شد و قطر آن در محدوده ۱۰ mm – ۰ گزارش شد. سپس قطر هاله عدم رشد توسط خط‌کش اندازه‌گیری شدند که در جدول ۵ قابل‌مشاهده است.

بحث

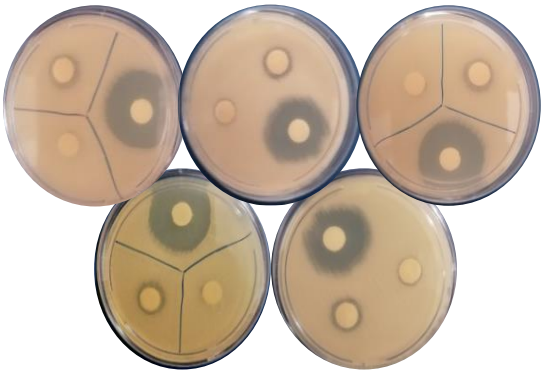
باتوجه‌به نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه در مورد شیوع ژن‌های موردنظر، می‌توان چنین نتیجه گرفت که شیوع این ژن‌ها در بین بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری بالا است. روش PCR یک ابزار کارآمد برای تشخیص سریع و شناسایی عوامل بیماری‌زایی عفونت ادراری در اشرشیاکلی است. درعین‌حال در این مطالعه مؤثرترین آنتی‌بیوتیک علیه ایزوله‌های موردمطالعه ایمی‌پنم است، اما در صورت تجویز بیش از حد، مقاومت به این آنتی‌بیوتیک نیز ممکن است رخ بدهد. عفونت دستگاه ادراری از نظر میزان شیوع، پس از عفونت تنفسی، در مرتبه دوم قرار دارد. با توجه به سهولت ابتلا به عفونت ادراری و عوارض بسیار خطرناک آن از جمله، نارسایی کلیوی، عفونت خون و زایمان زودرس، تشخیص زودرس و درمان به هنگام عفونت ادراری بسیار حائز اهمیت است. در بسیاری از امراض عفونی از جمله عفونت ادراری لازم است پزشک پیش از آغاز درمان نسبت به شناخت قطعی عامل عفونت و همچنین تعیین حساسیت عامل باکتریایی موجود به عوامل آنتی‌بیوتیکی، اقدام کند. هدف از این پژوهش بررسی بیان ژن *IutA* در سویه‌های اشرشیاکلی O157: H7 جدا شده از نمونه‌های عفونت ادراری در بیماران مراجعه‌کننده بوده است. به دلیل وجود محدودیت در تعداد نمونه‌ها و در اندازه‌گیری نمونه‌ها نمی توان از آن برای یک نتیجه‌گیری آماری وسیع استفاده کرد. همچنین، با در نظرگرفتن عوارض و مرگ‌ومیر ناشی از باکتری‌های بیماری‌زا، مخمرها و ویروس‌ها افرد اغلب

جدول ۵. قطر هاله عدم رشد بر حسب واحد mm

نمونه	1	1/2	1/4	1/8	آمپی‌سیلین
1	10	5	0	0	20
2	9	6	0	0	20
3	9	0	0	0	18
4	9	0	0	0	19
5	9	0	0	0	19

جدول ٦. درصد نتایج به‌دست‌آمده تست‌های MIC و MBC

+	+	-	-
MIC	MBC	MIC	MBC
12.5%	25%	12.5%	20%
12.5%	25%	12.5%	20%
15%	20%	12.5%	25%
12.5%	25%	10%	25%
12.5%	25%	12.5%	25%



شکل ۲. نتایج فعالیت مهارکنندگی پروبیوتیک بر روی سویه و هاله‌های عدم رشد

نگران میکروب‌های عمومی هستند. بااین‌وجود، در حال حاضر مجموعه‌ای از شواهد نشان می‌دهد که باکتری پروبیوتیک می‌تواند به‌سلامت انسان کمک کند (۲۴،۲۳). طبق تحقیقات انجام شده مکمل‌های غذایی، مانند برخی از پروبیوتیک‌ها، به‌عنوان گزینه‌ای معتبر برای کنترل بسیاری از بیماری‌ها ظاهر شده‌اند (۲۵). بنابراین، تلاش زیادی برای یافتن آنتی‌بیوتیک‌های بی‌خطر و طبیعی مانند پروبیوتیک‌ها در حال انجام است (۲۶).

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

در حال‌حاضر استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان جایگزین مناسبی مقابل میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و میکروارگانیسم‌های مسبب فساد مواد غذایی در نظر گرفته شده‌اند (۲۷). البته در برخی موارد عنوان شده است، تنها درصورتی‌که محیط‌های‌کشت حاوی باکتری پروبیوتیک غلیظ باشند و یا در pH خاصی قرار داشته باشند، می‌توان اثر مهاری آن را مشاهده کرد (۲۸). فاکتورهایی مانند pH اثر زیادی بر اتصال پروبیوتیک در ازبین‌بردن هاله رشد دارند (۲۹).

ازاین‌رو، در پژوهش حاضر به بررسی اثر مهاری باکتری پروبیوتیک بر روی باکتری اشرشیاکلی و سویه‌های بالینی پرداخته شده است. ویژگی مهم باکتری‌های پروبیوتیک، توانایی آنها برای مهار افزایش تعداد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و نیز مهار قدرت بیماری‌زایی آن‌ها است. باکتری‌های اسیدلاکتیک از جمله جنس لاکتوباسیلوس، با تولید عامل‌های ضدمیکروبی و نیز به‌کارگیری مکانیسم‌های مختلف، عملکرد بسیار مؤثری در این راستا دارند (۳۰). از دیگر باکتری‌های مؤثر بر روی عفونت ادراری ناشی از باکتری اشرشیاکلی می‌توان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[1] و *لاکتوباسیلوس کازئی* را نام برد. این دو باکتری می‌توانند با به دام‌انداختن و تجمع‌پذیری با باکتری *اشرشیاکلی یوروپاتوژن* سبب کاهش اتصال و مانع تشکیل بیوفیلم آن در شرایط آزمایشگاهی شوند (۳۱).

از بین عمده‌ترین باکتری‌های به‌دست آمده که شامل: اشرشیاکلی، کلبسیلا، انتروباکتر، سیتروباکتر، سودوموناس و استافیلوکوک‌ها هستند، اغلب این باکتری‌های ذکر شده فلور طبیعی بدن بوده و آنتی‌بیوتیک‌های رایج از جمله کوتریموکسازول و سیپروفلوکساسین نقش به‌سزایی در درمان عفونت‌ها دارند و به‌عنوان موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان باکتری اشرشیاکلی شناخته شده‌اند. (۳۲). در دهه گذشته مطالعات زیادی در مناطق مختلف دنیا بر روی جداسازی و بررسی فراوانی عوامل عفونت ادراری با روش‌های مختلف از جمله روش‌های کشت و یا تعیین هویت مولکولی انجام شده است.

گرازدانوف و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه‌ای ساختار ژنوم پروبیوتیک غیر بیماری‌زای *E. coli* Nissle1917 را بررسی کردند. آن‌ها در این پژوهش قسمت‌های مختلف کروموزوم گونه‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زای *E. coli* را با روش‌های آنالیز tRNA و بررسی جزایر ژنوم (GEIs) و بررسی DNA با روش هیبریداسیون DNA/DNA مطالعه کردند. شواهد حاصل از این مطالعه نشان داد که سیستم‌های مختلف جذب آهن، چسبنده‌ها و پروتئازها، می‌توانند به بقای موفقیت‌آمیز این سویه پروبیوتیک در روده انسان کمک کنند که به‌احتمال زیاد سبب ازبین‌رفتن *E. coli* توسط این سویه از پروبیوتیک می‌شود (۳۳).

فالاگاس و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه‌ای تأثیر باکتری های پروبیوتیک در جلوگیری از ابتلا به عفونت‌های ادراری در زنان را بررسی کردند. عفونت‌های مکرر مجاری ادراری تعداد زیادی از زنان در سراسر جهان را مبتلا می کند. استفاده از پروبیوتیک‌ها، به‌ویژه لاکتوباسیل‌ها، برای پیشگیری از ابتلا به عفونت‌های ادراری در نظر گرفته شده است. همچنین عفونت ادراری در زنان یائسه فراوانی بیشتری دارد و باعث بیماری‌زایی می‌شود، پیشنهاد شده که ترمیم فلور ادراری که تحت سلطه پاتوژن‌ها است، با استفاده از لاکتوباسیل‌ها در برابر عفونت ادراری محافظت شوند. مطالعات بسیاری از جمله آزمایش‌های حیوانی و میکروبیولوژیکی برای ارزیابی و بررسی اثربخشی و ایمنی پروبیوتیک‌ها در برابر یورو پاتوژن‌ها در زنان سالم و زنان مبتلا به عفونت ادراری انجام شده است. بسیاری از این بررسی‌ها یافته‌های دلگرم‌کننده‌ای برای برخی از گونه‌های خاص لاکتوباسیل‌ها داشتند. بر طبق نتایج، به نظر می‌رسید در بین لاکتوباسیل‌های مورد مطالعه، Lactobacillus rhamnosus GR-1 و L. reuteri RC- (که پیش‌تر L. *fermentum* RC-14 نامیده می‌شد) برای جلوگیری از UTI مؤثرتر است. L. *Casei shirota* و L. *crispatus* CTV-05 نیز در برخی مطالعات اثربخشی خود را

[1] *Lactiplantibacillus plantarum*

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

نشان داده‌اند. به نظر نمی‌رسد L. *rhamnosus* GG در پیشگیری از عفونت‌های ادراری به همان اندازه مؤثر باشند. شواهد حاصل از مطالعات موجود نشان داده است که پروبیوتیک‌ها می‌توانند برای پیشگیری از عفونت ادراری مکرر در زنان مفید باشند. همچنین، مشخصات ایمنی خوبی دارند. با این‌حال، تحقیقات بیشتری موردنیاز است (۱۶). فیجان و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهشی به بررسی فعالیت مولکولی گونه‌های مختلف گونه‌های پروبیوتیک تک زنجیره و چند زنجیره اشرشیاکلی پرداختند. مقاومت شدید گونه‌های بیماری‌زای *E. coli* به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها سبب شده است مطالعات در زمینه این باکتری بسیار موردتوجه محققان قرار گیرد. یکی از راه‌های مقابله با گونه‌های بیماری‌زا و مقاوم *E.coli* استفاده از گونه‌های پروبیوتیک است. هدف از این پژوهش بررسی و ارزیابی فعالیت عوامل آنتی‌گونیستی[1] با استفاده از محصولات پروبیوتیک تک زنجیره و چند زنجیره بر علیه پاتوژن‌های کلینیکی *E. coli* است (۳۴). احمدی و همکاران (۱۳۹۷) در مطالعه‌ای به بررسی شیوع ژن‌های حدت در اشرشیاکلی‌های جدا شده از موارد کلی باسیلوز طیور و عفونت دستگاه ادراری انسان پرداختند. در این مطالعه، شیوع ۴ ژن وابسته به حدت (*tsh*، *traT* ،*iutA* ،*sitA*) در ۲۶ جدایه APEC و ۲۵ ایزوله UPEC جدا شده از موارد بالینی مشکوک به عفونت اشرشیاکلی در آذربایجان غربی به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بررسی شده است. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار minitab 15 انجام شده است. در مورد جدایه‌های بیماری‌زا در عفونت ادراری انسان، بالاترین فراوانی را ترکیب *iutA-sitA-traT* داشته است، این احتمال وجود دارد که ژن‌های حدت بین طیور و انسان انتقال یابند.(۱۸). نعمتی و همکاران در سال(۱۳۹۳) به بررسی فراوانی اشرشیاکلی یوروپاتوژنیک مولد عفونت ادراری و تعیین برخی ژن‌های ویرولانس در ایزوله‌های جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان شهید بهشتی کاشان طی سال های ۹۲-۱۳۹۱ پرداختند. این مطالعه بر روی ژن‌های ویرولانس، *pai*، *traT* ، *aer*، *pap*، *hly* انجام شده است. در ادامه از ۳۷۰ نمونه‌ی ادرار جمع‌آوری شده از بیماران بستری در بیمارستان شهید بهشتی کاشان، مجموعه‌ای از ۱۵۰ ایزوله‌ی اشرشیاکلی جدا شد. باکتری اشرشیاکلی با استفاده از تکنیک‌های بیوشیمیایی و میکروب‌شناسی استاندارد شناسایی شد و بررسی شیوع فاکتورهای ویرولانس با استفاده از روش PCR انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد شیوع ژن‌های ویرولانس pai، traT وaer در میان سویه‌های اشرشیاکلی یوروپاتوژنیک جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان در منطقه‌ی بررسی شده بالا است. بنابراین، ژن‌های فوق می‌توانند به‌عنوان هدف در مداخلات درمانی مورد بررسی بیشتری قرار گیرند(۳۵). راشکی و همکاران (۱۳۹۴) در مطالعه‌ای به بررسی ارتباط گروه‌های فیلوژنتیکی با توزیع ژن‌های ویرولانس در ایزوله های اشرشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری پرداختند. این مطالعه برای تعیین فراوانی ژن‌های کدکننده عوامل ویرولانس و ارتباط آن‌ها با گروه فیلوژنتیکی در اشرشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری انجام شد. این مطالعه توصیفی تحلیلی روی ۱۰۰ ایزوله اشرشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری انجام شد. حضور ژن‌های کدکننده عوامل ویرولانس به روش multiplex-PCR بررسی شد. علاوه برآن تعیین گروه‌های فیلوژنتیکی شامل A, B1, B2 و D با استفاده از حضور یا عدم حضور ژن های *chuA* و *yjaA* و قطعه TspE4.C2 به روش triple-PCR انجام شد. ژن‌های ویرولانس در بین ایزوله‌های گروه B2 گسترش زیادی نسبت به سایر گروه‌های فیلوژنتیکی دارد (۳۶).

اثرات مفید مصرف پروبیوتیک‌ها به واسطه رشد باکتری‌های مفید روده یا کاهش بیماری‌زایی میکروب‌های مضر در تضمین سلامت بدن و به‌ویژه سلامت سیستم گوارشی بسیار چشمگیر است. با توجه به تاثیر مستقیم سیستم گوارش بر سیستم ایمنی بدن، پروبیوتیک‌ها با تولید هرچه بیشتر لنفوسیت‌ها موجب تقویت سیستم ایمنی بدن می‌شوند و از بروز بیماری‌های عفونی جلوگیری می‌کنند. مصرف پروبیوتیک‌ها سبب کاهش و ممانعت از جذب مواد آلرژی

[1] Antagonist

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

زای موجود در لبنیات از طریق روده می‌شود. پروبیوتیک توانایی مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا، از جمله باکتری اشرشیاکلی را دارند. در سال‌های اخیر مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج و مؤثر در درمان بیماری‌های عفونی به یکی از چالش‌های مهم تبدیل شده است (۳۷). مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از این جهت مهم است که در بسیاری از موارد هنگام بروز بیماری و زمانی که درمان با آنتی‌بیوتیک الزامی است، میکروارگانیسم‌های مقاوم شده به درمان پاسخ نمی‌دهند (۳۸).

نتیجه‌گیری

یکی از مهمترین جنبه‌های پژوهش حاضر عدم مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنتی‌بیوتیک مورد استفاده و نیز مشاهده هاله عدم رشد، توسط این آنتی‌بیوتیک است. پروبیویک مورد استفاده در این پژوهش نیز اثرات هم افزایی برای این آنتی بیوتیک داشته است. این امر نشانه دهنده این است که پروبیوتیک‌ها با القای مکانیسم‌هایی توانایی جایگزینی با آنتی‌بیوتیک‌ها را خواهند داشت.

منابع

1. Ghasemipour Z., SALEHZADEH A., ZAMANI H.. Prevalence of Pathogenicity Islands and Fim H Virulence Genes in Escherichia coli Strains Isolated from Urinary Tract Infection in Rasht City, Iran. JOURNAL OF ILAM UNIVERSITY OF MEDICALSCIENCES.2018[cited2022September07]; 26(3):63-71.
2. Mehryari, A., Parviz, M., Khalajzadeh, S. Identifying and determining the Classes I, II, and III papG Gene of Escherichia Coli Isolated from Patients with Urinary Tract Infections. Journal of Isfahan Medical School, 2015; 33(348): 1412-1419.
3. Mehdizadeh, M., Eskandari, S., Zavar, M., & Piroz, B. (2008). The Importance of Escherichia coli O157:H7 in Foodborn Infection. Journal of Kerman University of Medical Sciences, 15(4), 353-361.
4. Khawcharoenporn T, Vasoo S, Singh K. Urinary tract infections due to multidrugresistant Enterobacteriaceae: prevalence and risk factors in a Chicago Emergency Department. Emergency medicine international 2013; Volume 2013, Article ID 258517, 7 pages.
5. niksolat M, minaeian S, khodabandelou N, zandieh Z. The effect of probiotics in the prevention of urinary tract infections in elderly patients hospitalized in intensive care units. RJMS 2017; 24 (156) :32-41
6. Borchert D, Sheridan L, Papatsoris A, Faruquz Z, Barua JM, Junaid I, Pati Y, Chinegwundoh F, Buchholz N. Prevention and treatment of urinary tract infection with probiotics: Review and research perspective. Indian J Urol. 2008 Apr;24(2):139-44..
7. Da Silva, G. J., & Mendonça, N. (2012). Association between antimicrobial resistance and virulence in Escherichia coli. Virulence, 3(1), 18–28.
8. Ponnusamy PNV. In vitro biofilm formation by uropathogenic Escherichia coli and their antimicrobial susceptibility pattern. Asian Pac J Trop Med. 2012; 5(3): 210-213.
9. Bermudez BM, Plaza DJ, QS M, LC G, Gil A. Probiotic mechanisms of action. Ann Nutr Metab. 2012; 61: 160-174.
10. Hutt P, Shchepetova J, Loivukene K, Kullisaar T, Mikelsaar M. Antagonistic activity of probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria against entero and uropathogens. J App Microbiol. 2006; 100: 1324-1332.
11. 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.
12. Mahsa Sadri, Nazila Arbab Soleimani, Mohammad Mahdi Forghanifard, The study of Antimicrobial and Anti-adhesive effect of ProbioticLactobacilli on Uropathogenic Escherichia coli (UPEC), Biological Journal of Microorganism, 2016; 5(17): 159-170. magiran.com/p1561803.
13. Watson RR, Preedy VR. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Bioactive foods in health promotion. 1st ed. Academic Press; 2015.
14. Shawar RM ،Macloed DL ،Garber RL ،Burns .et al .Activation of Tobramycin and six other antibiotics against Pseudomonas aeroginosa isolated from patients with Cystics fibrosis .Antimicrobial Agent and chemothrerapy 1999;12:2877-88.
15. Escherichia coli. Vir. 2012; 3(1): 18-28. keikha, M., Rava, M. Trend of antibiotic resistance of Escherichia coli strains isolated from urinary tract infections in outpatient patients from Zahedan. Journal of Paramedical Sciences & Rehabilitation, 2017;6(4):73-78.
16. Falagas ME, Betsi GI, Tokas T, Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent urinary tract infections in women: a review of the evidence from microbiological and clinical studies. Drugs. 2006;66(9):1253-1261.
17. Nolan, L.K., Barnes, H.J., Vaillancourt, J.P., Abdul-Aziz, T., Logue, C.M. (2013). Colibacillosis In: Swayne D.E. (Eds) Diseases of poultry. Wiley-Blackwell, 13th edition, 751-805.
18. M Ahmadi, S Dadashzadeh, A Ghaniei, Prevalence of virulence genes in Escherichia coli isolates implicated in poultry colibacillosis and human urinary tract infection, Journal of Veterinary Microbiology, 2019; 15(1): 109-118.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

magiran.com/p2078475.
19. Schouler, C., Schaeffer, B., Brée, A., Mora, A., Dahbi, G., Biet, F., Oswald, E., Mainil, J., Blanco, J., Moulin-Schouleura, M. (2012). Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic Escherichia coli based on four patterns of virulence genes. Journal of Clinical Microbiology, 50(5):1673–1678.
20. Johnson, J.R., Brown, J.J. (1996). A novel multiply primed polymerase chain reaction assay for identification of variant papG genes encoding the Gal (alpha 1-4) Galbinding PapG adhesins of Escherichia coli. The Journal of Infectious Diseases, 173: 920-6.
21. DeLorenzo, V., Bindereif, A., Paw, B.H., Neilands, J.B. (1986). Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in Escherichia coli K-12. Journal of Bacteriology, 165:570-578.
22. Clinical and Laboratory Standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing Twenty-Third Informational Supplement, M100- S23.Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards institute; 2013.
23. Sarikhani, Z., Nazari, R., Nateghi Rostami, M. First report of OXA-143-lactamase producing Acinetobacter baumannii inQom. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2017; 20(11): 1282-1286.
24. Dudek-Wicher R, Junka A, Paleczny J, Bartoszewicz M. Clinical Trials of Probiotic Strains in Selected Disease Entities. *Int J Microbiol*. 2020 May28;2020:8854119.
25. Liu Y, Tran DQ, Rhoads JM. Probiotics in Disease Prevention and Treatment. J Clin Pharmacol. 2018 Oct;58 Suppl 10(Suppl 10):S164-S179.
26. Joint F. WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. 2002; 30
27. Chatterjee M, Anju C, Biswas L, Kumar VA, Mohan CG, Biswas R. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa and alternative therapeutic options. International Journal of Medical Microbiology 2016; 306(1): 48-58
28. López-Brea M, Alarcón T, Domingo D, Díaz-Regañón J. Inhibitory effect of Gramnegative and Gram-positive microorganisms against Helicobacter pylori clinical isolates.Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2008; 61(1): 139-142
29. Yang E, Fan L, Jiang Y, Doucette C, Fillmore S. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. Amb Express 2012; 2(1): 48
30. Sadri, M., Arbab Soleimani, N., Forghanifard, M. The study of Antimicrobial and Anti-adhesive effect of ProbioticLactobacilli on Uropathogenic Escherichia coli (UPEC). *Biological Journal of Microorganism*, 2016; 5(17):
31. Bandari S,Soleimani NA,Tajbakhsh E, The effect of probiotic lactobacilli on the attachment power and biofilm formation of Escherichia coli isolated from urinary tract infections. J of Microbial Word 2018;11(3): 278-287.
32. Nourouzi, Jamileh, Mohammad Kargar, F. Pourshahian, and M. Kamali. "Study on the prevalence of urinary tract infection by Escherichia coli, antibiotic resistance and plasmid profile of isolated bacteria in Jahrom city." (2006): 745-749.
33. Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, Sonnenborn U, Gottschalk G, Hacker J, et al. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917. J Bacteriol. 2004;186(16):5432-41.
34. Fijan S, Šulc D, Steyer A. Study of the In Vitro Antagonistic Activity of Various Single-Strain and Multi-Strain Probiotics against Escherichia coli. Int J Environ Res Public Health. 2018;15(7):1539. Published 2018 Jul 20.
35. Neamati F, Firoozeh F, Saffary M, Mousavi SG. The prevalence of uropathogenic E. coli and detection of some virulence genes isolated from patients referred to Kashan Shahid-Beheshti hospital during 2012-2013. KAUMS Journal (FEYZ). 2014 Jun 10;18(3):267-74.
36. Abdi HA, Rashki A. Relationship between phylogenetic group and distribution of virulence genes of Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infection. Journal of Gorgan University of Medical Sciences. 2015 Jun 10;17(2):92-7.
37. Karami, P., Aslani, M. M., Najafi Mosleh, M., & Alikhani, M. Y. (2012). Determination Pattern of Antibiotic Resistance in Entropathogenic Escherichia coli Strains Isolated from Children with Diarrhea. Avicenna Journal of Clinical Medicine, 19(1), 27-31.
38. Boniadian, M., Habibian, R., Barati, S., & Jostejo, T. (2014). Investigation the antibiotic resistance of the Escherichia coli isolated from gastroenteritis cases in Shahrekord county. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences, 15(6), 117-123.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]

Molecular study of probiotic effect on *IutA* gene in different strains of Escherichia coli separated from urinary tract infection

Mona Mohamma aliha[1],**Dr Roudabeh Behzadi Andouhjerdi[2*]**

[1]Department of Cellular and Molecular Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Bioligy, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Escherichia coli induced urinary tract infection urinary tract infections is a prevalent acquired infection in Iran. The *IutA* virulence gene plays a crucial role in the pathogenesis of *E. coli*, particularly in binding to epithelial cells. In addition, as a group of probiotics, lactobacilli have an important role in the body and are therapeutically benefits in some cases. This study aimes to molecularly investigate the effect of Lactobacillus casei PTCC 1608 on different strains of uropathogenic *E. coli* isolated from urinary infection through PCR. The desired strain of *E. coli* was isolated from patients with urinary tract infections and investigated through differentiation methods. The *IutA* gene of the desired strain was evaluated through PCR and then strains with positive genotypes were isolated and the antibacterial effect of Lactobacillus casei was evaluated through dilution and disc diffusion methods in a liquid medium. The antibacterial effect of Lactobacillus casei on antibiotic-resistant uropathogenic *E. coli* was studies. From a total of 40 samples isolated from the urine of patients with urinary tract infections, the results of MIC-MBC were either positive or negative. The antibiotic sensitivity test at the dilution of 1 to 10 showed an inhibition zone of 9 cm. These results indicated that the isolated bacterium was not resistant to ampicillin and the antibiotic did not lose its therapeutic effect. Moreover, the probiotic used has a therapeutic role and can improve urinary infections.

Keywords: ampicillin, antibiotic Resistance, europathogeni , *E.coli*, Lactobacillus casei, *IutA*, probiotics, PCR, Urinary tract infection

* roudabeh behzadi@iauctb.ac.ir

[Downloaded from amfi.ir on 2025-07-29]