



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*}

^۱گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

^۲گروه 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 ویرولانسی *iuta* در اشریشیاکلی عامل مهم پاتوژنیسیته و به‌ویژه اتصال این ارگانیزم 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 اشریشیاکلی پاتوژن جداسازی شده با روش PCR از عفونت‌های ادراری می‌باشد. در این مطالعه، سویه اشریشیاکلی 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 ضد میکروبی لاکتوباسیلوس کازئی به روش انتشار دیسک و رقت‌سازی در محیط مایع، بررسی شد. اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس کازئی روی باکتری اشریشیاکلی جداسازی شده از نمونه ادرار ۴۰ نفر از بیماران مبتلا به عفونت ادراری بررسی شد. همچنین، نتایج تست آنتی‌بیوتیکی از رقت ۱ تا ۱۰ به صورت 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 به کار رفته، دارای نقش درمانی بوده و باعث بهبود عفونت ادراری می‌شود.

واژگان کلیدی: آمپی‌سیلین، اشریشیاکلی (*E.coli*)، پروبیوتیک، ژن ویرولانسی *iuta* عفونت دستگاه ادراری، لاکتوباسیلوس کازئی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، یوروپاتوژنیک

* roudabeh behzadi@iauctb.ac.ir

است که به دلیل تشکیل بیوفیلم و همچنین ظهور مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری‌ها، استفاده از درمان آنتی‌بیوتیکی 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 سد کردن اتصال باکتری و جلوگیری از تشکیل بیوفیلم باکتریایی است.

از دیگر روش‌های آزموده شده در این زمینه و در چند دهه اخیر، استفاده از میکروارگانسیم‌های 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 میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا رقابت می‌کنند و دارای توانایی اتصال اختصاصی و غیراختصاصی برای جایگاه‌های هدف می‌باشند. اتصال اختصاصی زمانی انجام می‌شود که یک آدهسین (عامل چسبنده) سطح سلول باکتری به یک گیرنده سطح سلول اپی‌تلیال می‌زبان متصل شود که در اصطلاح این عملکرد قفل-کلید نامیده می‌شود. اتصال غیراختصاصی باکتری‌های پروبیوتیکی پدیده متداول‌تری است که به واسطه 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). به‌طور کلی 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 یوروپاتوژن‌ها است (۱۱). اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس کازئی در مقایسه با لاکتوباسیلوس‌های دیگر در حالتی که از سوپرناات پروبیوتیک استفاده می‌شود نیز بیشتر بوده و لاکتوباسیلوس کازئی دارای تجمع‌پذیری بیشتری با یوروپاتوژنیک بوده است (۱۲).

اشرشیاکلی^۱ 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، این گونه باکتری، ۰/۱٪ فلور روده را به خود اختصاص داده است (۲) و از استقرار باکتری‌های انتروباکتریاسه^۲ 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، در دسترس بودن دارو و سابقه عدم آزرژی بیماران انجام شود. باکتری‌های مورد بررسی در این مطالعه جزو خانواده انتروباکتریاسه می‌باشند (۴).

باتوجه به 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 میکروارگانسیم‌های زنده (پروبیوتیک) جایگزینی امیدوارکننده برای پیشگیری و درمان عفونت‌های مکرر دستگاه ادراری است (۶).

به‌طور کلی اولین راه برای مبارزه با عفونت‌های دستگاه ادراری به‌ویژه عفونت‌های ناشی از اشرشیاکلی اوروپاتوژن درمان با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها است. اما امروزه ثابت شده

² Enterobacteriaceae

¹ *Escherichia coli*

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 به کارگیری 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 نمونه ادراری از بخش میکروبیولوژی آزمایشگاه بیمارستان ناجا امام سجاد (ع) جمع‌آوری شد. سویه‌ی میکروبی اشرشیاکلی مورد استفاده از مرکز انستیتو پاستور با شماره ATCC 25922 تهیه شد و به عنوان کنترل مثبت ژن *IutA* استفاده شد (۱۹). همچنین، سویه لاکتوباسیلوس کازئی^۱ 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 مکانیکی آگار (باکتری‌های غیر تخمیری در این محیط بی‌رنگ هستند) و نیز کلنی‌های با جلای فلزی^۲ در محیط EMB، به عنوان سویه‌های اشرشیاکلی

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 بی‌ضرر 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). باتوجه به 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 آن یکی 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

² Methalic Sheen

¹ *Lactobacillus casei*

کشت مایع هیتون براث کشت داده شد. ابتدا ۳/۳۹ gr محیط کشت هیتون براث به عنوان 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 مرحله بعد استخراج DNA انجام شد است.

پرایمر مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

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 مورد نظر در PCR، تولید کم محصول PCR و یا از سوی دیگر منجر به تولید غیر اختصاصی محصولات PCR شود. در این پژوهش برای طراحی پرایمر ابتدا توالی ژن مورد مطالعه به فرمت FASTA از بانک‌های توالی اسید نوکلئیک به دست آمد. تمامی پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار Gene runner طراحی شده است. برای تخصیص دادن پرایمرهای طراحی شده، توالی فوق در پایگاه اطلاعاتی NCBI، BLAST، بررسی شده و میزان همپوشانی و واکنش متقاطع سایر ژن‌ها و ارگانسیم‌ها بررسی شد. مشخصات پرایمر اختصاصی مورد استفاده PCR در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۱. تست‌های تشخیصی باکتری

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

یوروپاتوژن^۱ انتخاب شدند. برای حصول اطمینان از صحت انتخاب کلنی‌ها، تست‌های بیوشیمیایی ذیل در مورد هر یک از کلنی‌های مورد نظر به صورت 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 تحرك باکتری (Motility) در محیط SIM

۴. تست اندول با استفاده از معرف کواکس

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

۶. تست اوره آز

در نهایت تعداد ۴۰ ایزوله یوروپاتوژن *E. coli* که واکنش مربوط به آن‌ها در مورد هر یک از تست‌های مذکور به شرح جدول ۱ بود، به عنوان 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 محیط‌ها 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، محیط کشت مایع ساخته شد و کلنی‌های تشکیل شده روی محیط کشت جامد در محیط

¹ *Escherichia coli* europathogen

جدول ۲. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR

نام پرایمر	توالی (۵' به ۳')	اندازه (bp)
<i>IutA</i>	F:GGCTGGACATCATGGGAAGCTGG	MK111112.1 (bp) ۳۰۲
	R: :CGTCGGAACGGGTAGAATCG	
	R: :CGTCGGAACGGGTAGAATCG	

جدول ۳. برنامه دمایی استفاده شده برای انجام واکنش PCR

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

دستگاه ژل داگ بررسی شد.

استخراج سوپرناتانت

جدایه لاکتوباسیلوس کازئی را با توجه به 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 مورد نظر (دو بار مثبت^۲ و دو بار منفی^۳) در محیط کشت مولر هیتون برات کشت تازه تهیه شد. سپس مقداری از هر باکتری در سرم فیزیولوژی استریل حل شد.

آنتی بیوگرام

برای به دست آوردن سویه باکتریایی *E.coli* و تأیید سویه مورد نظر، اشرشیاکلی پاتوژن از بیماران مبتلا به عفونت ادراری جداسازی شد و برای آنها رنگ آمیزی گرم انجام شد. این سویه پس از تأیید، برای تهیه سوسپانسیون سلولی جهت تست^۴ MIC استفاده شد.

ترکیب مواد و برنامه حرارتی مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 مورد نظر به علاوه 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^۱ برنامه دمایی شامل دناتوراسیون اولیه ۱۰ min در دمای ۹۵ °C، دناتوراسیون ۴۵ s در دمای ۹۵ °C، اتصال پرایمر اختصاصی ژن *papG* به مدت ۵۲ s در دمای ۵۸ °C برای ۴۰ سیکل و تکثیر نهایی به مدت ۲۵ s در دمای ۷۲ °C انجام شد (جدول ۳). در ادامه محصول حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی آگارز ۱٪ الکتروفورز شد (چاهک ۲ کنترل منفی)، (چاهک ۳ کنترل مثبت) و با استفاده از

³ Double Negative

⁴ Minimum Inhibitory Concent

¹ Thermocycler

² Double Positive

از باکتری پروبیوتیک در محیط مولر هینتون برات با غلظت $4 \mu\text{g}$ معادل 0.1 مک فارلند تهیه شد. سپس با سوآپ استریل به صورت 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 24 h در انکوباتور در دمای 37°C انکوبه شدند. قطر هاله عدم رشد توسط خط کش اندازه‌گیری شد. برای تجزیه و تحلیل 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 داده‌ها به صورت دوطرفه 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 معنی داری 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 می‌تواند با تفاوت‌های میان سویه‌های 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).

برای میزان تأثیر مستقیم پروبیوتیک، از مایع رویی کشت سلولی لاکتوباسیلوس استفاده شد. سویه بالینی لاکتوباسیلوس کازئی از مرکز کلکسیون و میکروارگانسیم ایران تهیه شد. برای انجام تست MIC از محیط مولر هینتون برات استفاده شد. سوسپانسیونی از باکتری به میزان استاندارد معادل نیم مک فارلند تهیه شد که در این سوسپانسیون معادل $10^8 \times 1/5$ cfu/ml باکتری طبق جدول استاندارد موجود می‌باشد.

تست MIC برای تأثیر کشندگی باکتری پروبیوتیک بر روی سویه موردنظر *E. coli* به روش میکروپلیت در حضور رقت‌های مختلف از باکتری پروبیوتیک (به‌عنوان پادزیست) انجام شد (۲۲). رقت‌های مختلف که شامل $1/20$ ، $1/25$ ، $1/50$ ، $1/100$ و $1/200$ (سویه پروبیوتیک) در محیط مولر هینتون برات در حجم $1 \mu\text{l}$ 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 $10^5 \mu\text{l}$ بود و سپس به مدت 24 h در دمای 37°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 مشاهده ایجاد کدورت در هر چاهک، چاهک قبلی به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد.

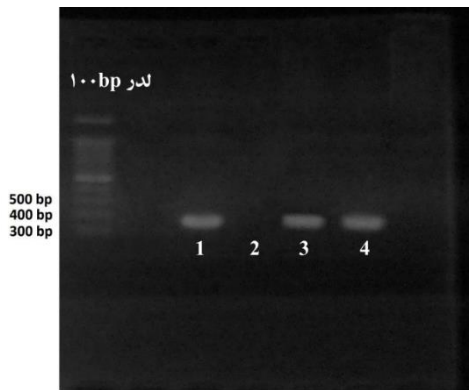
برای کنترل کیفی نمونه‌ها ابتدا یک گروه کنترل مثبت (محیط کشت به همراه باکتری) و یک گروه کنترل منفی (محیط کشت و ماده مورد تست) در نظر گرفته شد. پس از 24 h کدورت باکتری‌ها بررسی شده است.

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 48 ساعته باکتری لاکتوباسیلوس کازئی، $40 \mu\text{l}$ از سوپرناتانت با رقت‌های 1 ، $1/2$ ، $1/4$ ، $1/8$ به دیسک‌های مخصوص آنتی‌بیوگرام خالی اضافه شد.

در روش دیسک دیفیوژن ابتدا یک سوسپانسیون اولیه

شناسایی باکتری

در این پژوهش از آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای شناسایی حضور ژن‌های مورد نظر استفاده شده است. همچنین، از روش کشت سلولی نیز برای تأیید نتایج استفاده شده است. توالی و مشخصات پرایمرها مورد نظر با استفاده از مقالات و متون علمی به دست آمده است و از آن‌ها در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شده است. توالی مورد نظر 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.



شکل ۱. نتایج PCR. ستون: لدر (۱۰۰ جفت باز)، چاهک ۱، نمونه مثبت برای ژن *IutA*؛ چاهک ۲، نمونه کنترل منفی؛ چاهک ۳، نمونه مثبت برای ژن *IutA*؛ چاهک ۴، نمونه کنترل مثبت

همچنین، اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس کازئی بر روی اشرشیاکلی یوروپاتوزن در حالت کشت کامل باکتری‌های پروبیوتیک، به مراتب کمتر از حالت مشابه در آنتی‌بیوگرام‌ها بوده است. در آزمون بررسی اثر ضد میکروبی سوپرناتانت، بررسی کدورت لوله‌ها در نمونه‌های یوروپاتوزنیک 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 ضد میکروبی پروبیوتیک‌ها در سطح معناداری به رقت وابسته است. در رقت‌های بالاتر باکتری پروبیوتیک، قطر هاله عدم رشد کوچک‌تر شده است (جدول ۵).

نتایج تست‌های MIC-MBC

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

نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی

گزارش تست دیسک دیفیوژن

جدول ۴. 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 به عنوان کنترل مثبت در نظر 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

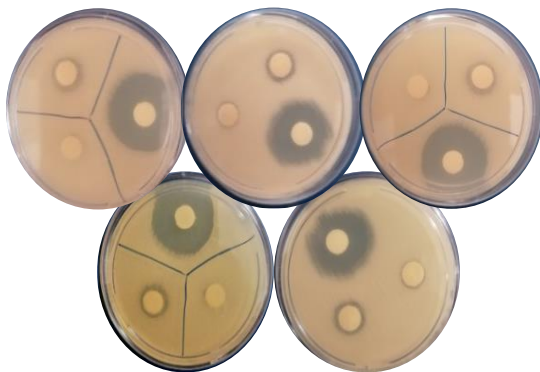
در آزمون کشت کامل باکتری‌های پروبیوتیک، میانگین قطر هاله عدم رشد اشرشیاکلی یوروپاتوزن توسط لاکتوباسیلوس کازئی ۹ mm بود، اما بر روی شاهد ۱۹ mm گزارش شد.

جدول ۵. قطر هاله عدم رشد بر حسب واحد mm

نمونه	1	1/2	1/4	1/8	آمپی سیلین
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 ۶. درصد نتایج به دست آمده تست های 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 سوبه و هاله های عدم رشد

نگران میکروبه های عمومی هستند. با این وجود، در حال حاضر مجموعه ای از شواهد نشان می دهد که باکتری پروبیوتیک می تواند به سلامت انسان کمک کند (۲۴، ۲۳). طبق تحقیقات انجام شده مکمل های غذایی، مانند برخی از پروبیوتیک ها، به عنوان گزینه ای معتبر برای کنترل بسیاری از بیماری ها ظاهر شده اند (۲۵). بنابراین، تلاش زیادی برای یافتن آنتی بیوتیک های بی خطر و طبیعی مانند پروبیوتیک ها در حال انجام است (۲۶).

همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود بررسی اثر مهارتی دیسک آنتی بیوتیک با غلظت ۴ μg بر روی ۵ نمونه جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری، صورت گرفته است. هاله عدم رشد ایجاد شده به صورت جداگانه مورد بررسی شد و قطر آن در محدوده ۱۰-۰ mm گزارش شد. سپس قطر هاله عدم رشد توسط خط کش اندازه گیری شدند که در جدول ۵ قابل مشاهده است.

بحث

باتوجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه در مورد شیوع ژن های مورد نظر، می توان چنین نتیجه گرفت که شیوع این ژن ها در بین بیماران مبتلا به عفونت مجاری ادراری بالا است. روش PCR یک ابزار کارآمد برای تشخیص سریع و شناسایی عوامل بیماری زایی عفونت ادراری در اشرشیاکلی است. در عین حال در این مطالعه مؤثرترین آنتی بیوتیک علیه ایزوله های مورد مطالعه ایمپی پنم است، اما در صورت تجویز بیش از حد، مقاومت به این آنتی بیوتیک 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 آنتی بیوتیکی، اقدام کند. هدف از این پژوهش بررسی بیان ژن *Iuta* در سوبه های اشرشیاکلی O157: H7 جدا شده از نمونه های عفونت ادراری در بیماران مراجعه کننده بوده است. به دلیل وجود محدودیت در تعداد نمونه ها و در اندازه گیری نمونه ها نمی توان از آن برای یک نتیجه گیری آماری وسیع استفاده کرد. همچنین، با در نظر گرفتن عوارض و مرگ و میر ناشی از باکتری های بیماری زا، مخمرها و ویروس ها افراد اغلب

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* Nissle 1917 را بررسی کردند. آن‌ها در این پژوهش قسمت‌های مختلف کروموزوم گونه‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زای *E. coli* 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 به احتمال زیاد سبب از بین رفتن *E. coli* توسط این سویه از پروبیوتیک می‌شود (۳۳).

فالاکاس و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه‌ای تأثیر باکتری‌های 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 می‌کند. 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 یوروپاتوژن‌ها 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-1 (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

در حال حاضر 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 در صورتی که محیط‌های کشت حاوی باکتری پروبیوتیک غلیظ باشند و یا در pH خاصی قرار داشته باشند، می‌توان اثر مهاري آن را مشاهده کرد (۲۸). فاکتورهایی مانند pH اثر زیادی بر اتصال پروبیوتیک در از بین بردن هاله رشد دارند (۲۹).

از این رو، در پژوهش حاضر به بررسی اثر مهاري 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 ضد میکروبی 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^۱ و لاکتوباسیلوس کازئی را نام برد. این دو باکتری می‌توانند با به دام انداختن 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 سپروفلوکساسین نقش به‌سزایی در درمان عفونت‌ها دارند و به‌عنوان مؤثرترین 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

¹ *Lactiplantibacillus plantarum*

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 این حال، تحقیقات بیشتری مورد نیاز 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 مورد توجه 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^۱ 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*، *aitA*، *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 پلیمرز (PCR) بررسی شده است. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار 15 minitab 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 ویروالانس در ایزوله‌های جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان شهید بهشتی کاشان طی سال‌های ۹۲-۱۳۹۱ پرداختند. این مطالعه بر روی ژن‌های ویروالانس، *traT* *pai*، *aer*، *hly* *pap* 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 ویروالانس با استفاده از روش PCR انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد شیوع ژن‌های ویروالانس *traT*، *pai* و *aer* 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 ویروالانس در ایزوله‌های اشرشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری پرداختند. این مطالعه برای تعیین فراوانی ژن‌های کدکننده عوامل ویروالانس 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 ویروالانس به روش multiplex-PCR بررسی شد. علاوه بر آن تعیین گروه‌های فیلوژنتیکی شامل A، B1، B2 و D با استفاده از حضور یا عدم حضور ژن‌های *chuA* و *yjaA* و قطعه TspE4.C2 به روش triple-PCR انجام شد. ژن‌های ویروالانس 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

^۱ Antagonist

6. Borchert D, Sheridan L, Papatsoris A, Faruqz Z, Barua JM, Junaid I, Pati Y, Chingwundoh 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 Probiotic *Lactobacilli* 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 aeruginosa* isolated from patients with Cystics fibrosis. *Antimicrobial Agent and chemotherapy* 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.

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، میکروارگانسیم‌های 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. پروبیوتیک مورد استفاده در این پژوهش نیز اثرات هم افزایی برای این آنتی‌بیوتیک 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[cited 2022 September 07]; 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

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.
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 in Qom. *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 Gram-negative 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 Probiotic Lactobacilli 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*

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

Mona Mohammad aliha¹, Dr Roudabeh Behzadi Andouhjerdi^{2*}

¹Department of Cellular and Molecular Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Department of Biology, 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 aims 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 studied. 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, uropathogeni , *E.coli*, *Lactobacillus casei*, *IutA*, probiotics, PCR, Urinary tract infection

* roudabeh behzadi@iauctb.ac.ir