



مقاله پژوهشی

تأثیر بخشی شناور فاقد سلول لاکتوباسیلوس کازئی بر بیان ژن اینتگرون کلاس یک در جدایه‌های بالینی/اسنتوباکتر بومانی به روش Real time PCR

امیر جلیلیان، غلامعلی مرادلی^{*}، کیومرث امینی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۸/۰۸

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۶/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: شایع‌ترین راه انتشار ژن‌های مقاومتی و پیدایش گونه‌هایی با مقاومت چندگانه (MDR) در/اسنتوباکتر بومانی، وجود عناصر ژنتیکی بنام اینتگرون است. از این رو در سال‌های اخیر استفاده از پروبیوتیک‌ها در کاهش عوارض باکتری‌های مقاوم و شکست درمانی توصیه شده است. لذا، هدف از انجام این پژوهش تأثیر سوپرناتانت پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی بر بیان ژن اینتگرون کلاس ۱ در جدایه‌های اسنتوباکتر بومانی به روش Real time PCR است.

مواد و روش‌ها: تعداد ۶۰ نمونه بالینی از خون، ترشحات تنفسی، ادرار، زخم از بیمارستان‌های شهر ساوه جمع‌آوری شد. حضور ژن *intI* با استفاده از روش PCR بررسی شد. پس از تیمار سویه‌ها با غلظت زیر sub-MIC از سوپرناتانت لاکتوباسیلوس کازئی، mRNA استخراج و آزمون Real time PCR به منظور تعیین سطح بیان ژن اینتگرون انجام گرفت و در نهایت میزان بیان با استفاده از روش Δct تعیین شد. آنالیز میزان بیان با اندازه‌گیری نسبی بیان mRNA در مقایسه با سویه استاندارد در SPSS نسخه ۱۸ و انجام تحلیل آماری با استفاده از t-test انجام گرفت.

نتایج: از ۱۲ ایزوله/اسنتوباکتر بومانی به دست آمده، شیوع ژن *IntI* ۱۰۰٪ بود. میزان Fold Change برای ژن *intI* برابر ۱/۱۸- که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار نسبت به گروه غیر تیمار شده کاهش یافته است ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که سوپرناتانت پروبیوتیکی توانست میزان بیان ژن *intI* را کاهش دهد؛ بنابراین استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان مکمل یا جایگزین درمانی در کنترل عفونت‌های میکروبی مقاوم به درمان، پیشنهاد می‌گردد. لذا با افزایش مقاومت دارویی پژوهش‌های بیشتر در این زمینه لازم و ضروری به نظر می‌رسد.

کلمات کلیدی: اسنتوباکتر بومانی، لاکتوباسیلوس کازئی، اینتگرون، Real time PCR

مقدمه

اسنتوباکتر بومانی یک کوکو باسیل گرم منفی هوازی فرصت‌طلب و غیر تخمیری در حال گسترش است که گروه‌های مختلفی از مردم، به‌ویژه بیماران بستری شده بیمارستان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱). باکتری، پنومونی، مننژیت، عفونت‌های مجاری ادراری و عفونت‌های زخم شایع‌ترین عفونت‌هایی است که به‌وسیله این ارگانیزم ایجاد می‌شود (۲). میزان مشارکت اسنتوباکتر بومانی در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی به‌صورت هشداردهنده‌ای بالاست (۲۸/۶٪) و بعد از استافیلوکوکوس اورئوس (۳۰/۹٪) دومین جایگاه را به خود اختصاص می‌دهد (۳). عفونت‌های ناشی از اسنتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو با افزایش هزینه‌های درمانی و بستری شدن طولانی‌مدت در بیمارستان و شکست درمانی و مرگ‌ومیر همراه است (۴). عناصر متحرکی مانند پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها از مؤثرترین عناصر ژنتیکی هستند که در اکتساب و پخش عوامل مقاومت در سویه‌های اسنتوباکتر بومانی نقش دارند و در این بین،

اسنتوباکتر بومانی یک کوکو باسیل گرم منفی هوازی فرصت‌طلب و غیر تخمیری در حال گسترش است که گروه‌های مختلفی از مردم، به‌ویژه بیماران بستری شده بیمارستان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱). باکتری، پنومونی، مننژیت، عفونت‌های مجاری ادراری و عفونت‌های زخم شایع‌ترین عفونت‌هایی است که به‌وسیله این ارگانیزم ایجاد می‌شود (۲). میزان مشارکت اسنتوباکتر بومانی در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی به‌صورت هشداردهنده‌ای بالاست (۲۸/۶٪) و بعد از استافیلوکوکوس اورئوس (۳۰/۹٪) دومین جایگاه را به خود اختصاص می‌دهد (۳). عفونت‌های ناشی از اسنتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو با افزایش هزینه‌های درمانی و بستری شدن طولانی‌مدت در بیمارستان و شکست درمانی و مرگ‌ومیر همراه است (۴). عناصر متحرکی مانند پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها از مؤثرترین عناصر ژنتیکی هستند که در اکتساب و پخش عوامل مقاومت در سویه‌های اسنتوباکتر بومانی نقش دارند و در این بین،

*نویسنده مسئول: غلامعلی مرادلی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه،
Email: moradli.mic@gmail.com
ایران
<https://orcid.org/0000-0002-6622-2026>

داروهای ضد میکروبی رایج قبلی باشد (۱۵). لذا هدف از این پژوهش تأثیر سوپرناتانت پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی بر بیان ژن اینتگرون/سنتیوباکتر بومانی به روش Real time PCR است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

این مطالعه توصیفی-مقطعی با کد اخلاق IR. IAUS.REC. 1399.34 در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه و در یک بازه زمانی ۷ ماهه از ابتدای مهر ۱۳۹۸ لغایت انتهای فروردین ۱۳۹۹ انجام گردید. تعداد ۶۰ نمونه بالینی از خون، ترشحات تنفسی، ادرار، زخم از بیمارستان‌های شهر ساوه جمع‌آوری شد. پس از انتقال بلیت‌های میکروبی به آزمایشگاه میکروب‌شناسی، تمامی نمونه‌ها با استفاده از آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی از جمله رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز و کاتالاز، اکسیداسیون گلوکز، دکربوکسیلاسیون لیزین، هیدرولیز آرژنین، سیمون سیترات، اکسیداسیون/تخمیر SIM، TSI، (O/F) و اوره‌شناسایی شدند. پس از تأیید نهایی باکتری‌های جدا شده از نظر جنس و گونه به‌عنوان اسینتوباکتر بومانی، کلنی‌های باکتری وارد محیط نگهدارنده گردید. محیط نگهدارنده شامل محیط تریپتی کیس سوی برات (TSB) (مرک، آلمان) حاوی (۱۵٪) گلیسرول بود.

بررسی وجود ژن intI به روش PCR

استخراج DNA به روش جوشاندن (Boiling Method) انجام گرفت. کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) و OD=260/280=1.8-2nm مورد آنالیز قرار گرفت. پس از ثبت و سفارش توالی پرایمرها شامل پرایمر فروروار: 5'-F=3'-GACGATGCGTGGAGACC- و ریورس 5'-R=3'-CTTGCTGCTTGGATGCC با طول محصول آمپلیکون ۱۲۰ جفت باز توسط شرکت پیشگام (تهران)، صحت آن‌ها در سایت NCBI و با استفاده از نرم‌افزار BLAST مورد تأیید قرار گرفتند (۱۶). واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۸/۵ میکرولیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی Taq DNA polymerase (0.05 U/μl)، 3 mM MgCl₂ و 1 mM dNTPs (0.4mM) (R و F) از پرایمرها (R و F) به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰

مطالعات مختلف نشان می‌دهند که مقاومت چند دارویی در این باکتری‌ها به‌صورت فراوانی در ارتباط باوجود اینتگرون‌ها و کاست‌های ژنی می‌باشند (۵). اینتگرون‌ها المنت‌های ژنتیکی متحرکی هستند که با قرارگیری در پلاسمیدها، کروموزوم‌ها و ترانسپوزون‌ها، ژن‌های مقاومتی را در که در داخل کاست‌های ژنی قرار دارند حمل و جابه‌جا می‌کنند (۶). انتقال افقی اینتگرون‌ها به‌عنوان موفق‌ترین راه انتشار ژن‌های مقاومتی و پیدایش گونه‌هایی با مقاومت بر روی اینتگرون‌ها قرار دارند و می‌توانند از یک‌سویه به سویه دیگر منتقل شوند، لذا این امر اهمیت شناسایی این نوع از ژن‌های مقاومتی را ضروری می‌نماید (۷ و ۸). اینتگرون‌ها توالی‌هایی از DNA حفاظت‌شده بنام intI می‌باشند که ژن اینتگراز را کد می‌کنند و باعث انتقال و الحاق کاست‌های ژنی از طریق مکانیسم‌های نو ترکیبی در جایگاه‌های ویژه می‌شوند. تمام اینتگرون‌ها دارای ناحیه حفاظت‌شده 5'-(CS) و (3'-CS) و حاوی ژن‌های intI و attI می‌باشند. بیشتر اینتگرون‌های سویه‌های بالینی خانواده انتروباکتریاسه‌ها، از کلاس ۱ هستند. رایج‌ترین کاست اینتگرون حاوی ژن‌های مرتبط با مقاومت در برابر طیف وسیعی از عوامل ضد میکروبی، آنتی‌بیوتیک‌ها، آنتی‌سپتیک‌ها، دزانتکتانت‌هاست (۹). به‌طورمعمول داروهای ضد باکتریایی از طریق تداخل با ساختار یا فرایندهای ضروری بقاء و رشد باکتری، بدون اینکه به میزبان یوکاریوتی آسیب وارد شود، باکتری را از بین می‌برند مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه‌های مختلف یک مشکل سلامتی عمومی در جهان محسوب می‌شود که افزایش روزافزون آن در سطح جهان مطرح است (۱۰). باکتری‌های مقاوم به دارو مشکلات عمده‌ای را در زمینه طراحی و ساخت داروهای شیمیایی ایجاد کرده‌اند (۱۱). این باکتری‌ها به‌سرعت به انواع مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌شوند، در نتیجه روند درمان عفونت‌های حاصله از این باکتری‌ها با مشکل مواجه شده است (۱۲).

لاکتوباسیلوس کازئی یک باکتری گرم مثبت، مزوفیل هموفرمونتاتیو اجباری، میکروآئروفیل، کاتالازمنفی و یکی از انواع پروبیوتیک‌ها بوده که کاربرد وسیعی دارد (۱۳). بقا این باکتری بیشتر از سایر گونه‌هاست در مطالعات متعدد اثرات سودمند آن از جمله مقاومت به اسید معده و نمک‌های صفراوی، قدرت چسبندگی به سلول‌های مخاط روده، مهار فعالیت باکتری‌ها و تولید مواد ضد میکروبی به اثبات رسیده است (۱۴). از این رو به نظر می‌رسد باکتری مذکور می‌تواند جایگزین مناسبی برای



برای حذف DNA ژنومی از کیت DNase Qiagen استفاده شد. بررسی کمی RNA استخراج شده از روش جذب نوری (2 nm) - $1/8$ (OD= $260/280$) استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم Reverse AMV با غلظت 25 Iu/unit (شرکت Roche) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرو لیتر با استفاده از کیت شرکت (Genet bio CAT. NO: Q910) کره جنوبی به صورت زیر انجام شد: ۱۰ میکرو لیتر از Prime Depc 5، Qmaster mix (2x) with syber green، یک میکرو لیتر از پرایمر فوروارد، یک میکرو لیتر از پرایمر ریورس، یک میکرو لیتر از Rox dye و ۲ میکرو لیتر از cDNA استفاده شد. تکثیر قطعه‌های مورد نظر در دستگاه Corbet برنامه دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، تکثیر شامل ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی گراد برای مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۶۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن خانگی 16s rRNA به عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد. سپس برای محاسبه میزان بیان ژن اینتگرون و رسم نمودارهای مربوطه از نرم افزار مشخص و مقدار بیان ژن هدف محاسبه شد (۱۷).

آنالیز آماری

آنالیز میزان بیان با اندازه گیری نسبی بیان mRNA در مقایسه با سویه استاندارد انجام شد. پس از ثبت داده‌ها در SPSS نسخه ۱۸، تحلیل آماری با استفاده از آزمون t-test در دو گروه تیمار و غیر تیمار انجام گرفت. سطح معنی داری در این مطالعه کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. همچنین Confidence Level با ضریب اطمینان ۹۵٪ محاسبه گردید.

نتایج

در این مطالعه تعداد ۶۰ نمونه بالینی به ترتیب برابر زخم (۲۹ عدد، ۴۸/۳٪)، ترشحات تنفسی (۲۶ عدد، ۴۳/۳٪)، خون (۱۰ عدد، ۱۰/۶٪) و ادرار (۵ عدد، ۸/۳٪) بود. میانگین سنی افراد در این مطالعه ۱۴ الی ۶۸ سال با میان ۳۲±۸ بود. همچنین تعداد ۳۴ (۵۶/۶٪) نمونه از خانم‌ها و ۲۶ (۴۳/۳٪) نمونه از آقایان به دست آمد. از مجموع ۶۰ نمونه، تعداد ۱۲ سویه (۲۰٪) /سینتوباکتر بومانی با استفاده از آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی به دست آمد که همگی آن‌ها حامل ژن intI بودند. نتایج آزمون MIC به روش میکرو دیالوشن برای CFS پروبیوتیک در برابر سویه‌های اینتگرون مثبت

نانوگرم) و ۱۳/۵ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر استریل با استفاده از گرادینت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) با دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه برای ۳۱ سیکل شامل؛ دناتوراسیون در ۹۴ درجه سلسیوس ۶۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۵۴ درجه سلسیوس برای ۵۰ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس برای ۷ دقیقه در نظر گرفته شد. برای مشاهده نتیجه تکثیر هر یک از ژن‌های مورد مطالعه، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ در شرایط ۱۵۰ ولت در بافر TBE×10 تجاری (Fermentase) انجام شد.

تعیین کمترین غلظت مهاری (MIC) لاکتوباسیلوس کازئی به روش میکرو دیالوشن براث

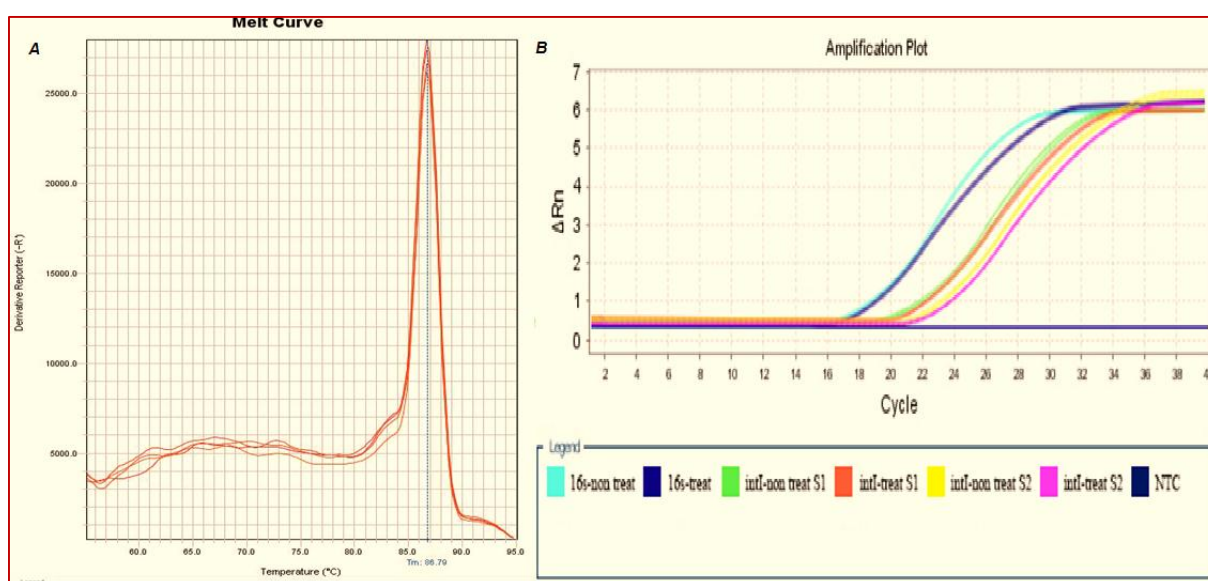
از غلظت‌های مورد نظر از ۲۵۰ تا ۰/۱۲ برای سوپرناتانت عاری از سلول (cell-free supernatant) سویه لاکتوباسیلوس کازئی PTCC 1608 تهیه شده از مرکز کلکسیون میکروبی ذخایر زیستی ایران استفاده شد. برای بهبود رشد و غنی سازی، روی محیط براث (MRS) de Man, Rogosa and Sharpe کشت داده شدند و سپس به مدت ۲۴ ساعت و با وجود مکمل ۰/۰۵٪ سیستین و در گرمخانه ۳۷ °C گرمخانه گذاری شدند و پس از آن با استفاده از Phosphate-buffered saline (PBS) مقدار 10^7 CFU از سوسپانسیون از باکتری‌ها تهیه شد. به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون ۲۴ ساعته /سینتوباکتر بومانی حامل ژن intI اضافه گردید. همچنین میزان ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون پروبیوتیک معادل 5×10^5 cfu/ml اضافه گردید. سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند و میزان حداقل غلظت بازدارندگی مطابق با دستورالعمل امین نژاد و همکاران (۱۳۹۲) (۱۳) تعیین گردید.

تعیین میزان بیان ژن intI تحت تأثیر لاکتوباسیلوس کازئی

قبل از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به میزان ۰/۱ mg/ml از لاکتوباسیلوس کازئی از غلظت sub-MIC در حجم ۲۰ میلی لیتر در محیط لوریا برتانی براث (مرک، آلمان) ریخته و معادل نیم مک فارلند به آن /سینتوباکتر بومانی حامل ژن intI اضافه شد. پس از ۱۵ ساعت انکوبه گذاری (Late log phase) بهترین مرحله برای استخراج RNA است. پس از گذشت ۱۵ ساعت استخراج RNA به شرح ذیل انجام شد. به منظور استخراج RNA از میکرو کیت RNeasy (شرکت Qiagen) استفاده شد و

اهمیت مطالعه و شناسایی آن‌ها جهت اجرای برنامه‌های کنترل عفونت و ممانعت از انتشار سویه‌های مقاوم را مطرح کردند (۱۸). در مطالعه‌ای که توسط سلطان دلال و همکاران (۲۰۱۵)، در شهر تهران انجام شد، نشان دادند که دو باکتری لاکتوباسیلوس پلاتناروم و لاکتوباسیلوس روتری در شرایط غیرفعال دارای فعالیت ضد باکتریایی علیه *اسینتوباکتر بومانی* نبودند، ولی در حالت فعال یعنی زمانی که باکتری توانایی تولید ترکیباتی نظیر آب‌اکسیژنه و اسید را داشته و یا تحت چنین شرایطی قرار گیرند می‌تواند خاصیت ضد باکتریایی داشته باشد (۱۹). در تحقیق حاضر اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس کازئی بر بیان ژن اینتگرون

اسینتوباکتر بومانی برابر $62/5 \mu\text{g/ml}$ بود. نتایج آزمون منحنی دما (melt curve) در آزمون real-time PCR نشان داد که بهترین دما جهت تکثیر پرایمرهای استفاده شده $T_m=86.79^\circ\text{C}$ بود (شکل ۱A). همچنین نمودار تکثیر نشان داد که میزان بیان ژن در سویه‌های intI-treat S2 در مقایسه با کنترل داخلی کاهش بیان (downregulation) داشته است (شکل ۱B). نتایج آنالیز آماری نشان داد که میزان P-value برای ژن intI از میزان ۰/۰۵ کمتر است ($P\text{-value}=0/026$) که بیانگر معنادار بودن اختلاف بیان این دو ژن در بین دو گروه تیمار شده و تیمار نشده است (Fold Change=1/18).



شکل ۱- منحنی ذوب (A) و منحنی تکثیر (B)

مشهود بود. در تناقض با مطالعه کنونی شریف و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه‌ای تحت عنوان بررسی اثر پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم بر بیان ژن MexA سیستم افلاکس پمپ در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به دارو در سال ۱۳۹۸ دریافتند که پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم فعالیت مهارتی و آنتی باکتریال با پتانسیل ضعیفی برای کاهش عملکرد پمپ افلاکس MexAB-OprM در *سودوموناس آئروژینوزا* را دارد ($P>0/05$) (۲۰). این اختلاف می‌تواند در نتیجه نوع میکروب مطالعه شده، ژن تحت بررسی و سویه پروبیوتیکی مورد استفاده باشد. مطالعات نشان داده‌اند که خاصیت ضد میکروبی باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک، مربوط به تولید ترکیب‌هایی مثل اسیدلاکتیک و اسید استیک دی استیل، هیدروژن پراکسید، اسیدهای چرب، آلدئیدها و کاهش pH است (۲۱ و ۲۲). Carey و همکاران در

بحث

عفونت با سویه‌های مقاوم به درمان *اسینتوباکتر بومانی* دارای عوارض جانبی کلینیکی شامل؛ طولانی شدن زمان بستری، افزایش هزینه‌های درمانی و مرگ‌ومیر بالا است (۵). از این رو یافتن راهکاری که بتواند دارای عوارض جانبی کم، عدم تحمل هزینه بالا و در دسترس بودن مورد توجه است (۶). پروبیوتیک‌ها و از جمله لاکتوباسیلوس‌ها که دارای نقش مهارکننده بر روی برخی از پاتوژن‌ها را دارند امروزه مورد استقبال قرار گرفته‌اند. ضیغمی و همکاران (۱۳۹۲)، در یک پژوهش مروری تحت عنوان اینتگرون‌ها و نقش آن‌ها در بروز مقاومت با بررسی کامل کلاس-های مختلف اینتگرون و سوپر اینتگرون‌ها و کاست‌های ژنی و شرح کامل نقش اینتگرون‌ها در انتقال مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی،



می‌دهند و میزان افزایش رشد باکتری وابسته به غلظت پروبیوتیک است. نتیجتاً پروبیوتیک با حداقل دوز مصرفی می‌تواند به‌عنوان مکمل یا جایگزین مناسبی در عفونت‌های /اسنیتوباکتر بومانی، همراه با مزایایی مانند جلوگیری از بروز اثرات نامناسب در مراحل درمان، صرفه‌جویی در مصرف دارو و کاهش هزینه‌ها باشد. به‌طور کلی با توجه به ضرورت سنجش متغیرهای اساسی، مطالعات بیشتر و بررسی‌های تکمیلی‌تر را می‌طلبد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه آزمایشگاه تحقیقاتی- میکروبیولوژیکی پاسارگاد که ما را در هدایت این مطالعه یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

این مطالعه توصیفی-مقطعی با کد اخلاق IR. IAUS.REC. 1399.34 در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه و در یک بازه زمانی ۷ ماهه از ابتدای مهر ۱۳۹۸ لغایت انتهای فروردین ۱۳۹۹ انجام گردید.

تعارض منافع

در بین نویسندگان مقاله هیچ‌گونه تضاد و تعارضی وجود ندارد.

سال ۲۰۰۸ (۲۳) دریافتند که مشاهده کردند که تمامی پروبیوتیک‌های تست‌شده می‌توانند میزان بیان stx2A را در سطح پایین تنظیم کنند که بامطالعه حاضر مطابقت دارد. این نشان می‌دهد که پروبیوتیک‌ها می‌توانند قدرت ویروالانس باکتری‌های پاتوژن را کاهش دهند. از نقاط قوت پژوهش فعلی می‌توان به استفاده از سویه بومی پروبیوتیک و انتخاب سویه مقاوم به درمان اسنیتوباکتر بومانی است اما در مقابل از نقاط ضعف مطالعه حاضر نیز می‌توان به عدم ارائه یک الگوی حساسیت دارویی برای سویه‌های تحت مطالعه، تخلیص جز فعال سوپرناتانت با استفاده از روش‌هایی نظیر HPLC و یا کروماتوگرافی است. پیشنهاد می‌گردد که در مطالعات بعدی اثر سایر سویه‌های بومی پروبیوتیکی بر سایر پاتوژن‌های مقاوم عامل عفونت‌های بیمارستانی نیز بررسی گردد تا بتوان با یک تصمیم‌گیری صحیح راه‌حلی مناسب جهت کاهش بروز و انتشار مقاومت دارویی اتخاذ نمود.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که مکمل درمانی با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس، اثرات ضد باکتری خوبی را علیه گونه‌های اسنیتوباکتر نشان

References

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 2008; 21(3):538-82.
2. Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *The Lancet infectious diseases*. 2008 1; 8(12):751-62.
3. Villers D, Espaze E, Coste-Burel M, Giauffret F, Ninin E, Nicolas F, Richet H. Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections: microbiological and clinical epidemiology. *Annals of internal medicine*. 1998; 129(3):182-9.
4. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature reviews microbiology*. 2007; 5(12):939-51.
5. Akrami F, Rajabnia M, Pournajaf A. Resistance integrons; A Mini review. *Caspian Journal of Internal Medicine*. 2019; 10(4):370.
6. Pournajaf A, Razavi S, Irajian G, Ardebili A, Erfani Y, Solgi S, Et al, Integron types, antimicrobial resistance genes, virulence gene profile, alginate production and biofilm formation in Iranian cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Infez Med*. 2018; 26(3):226-36. [In Persian]
7. Cambray G, Guerout AM, Mazel D. Integrons. *Annual review of genetics*. 2010; 44:141-66.
8. Al-Hammadi MA, Al-Shamahy HA, Ali AQ, Abdulghani MA, Pyar H, Al-Suboal I. Class 1 Integrons in Clinical Multi Drug Resistance *E. coli*, Sana'a Hospitals, Yemen. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*. 2020; 23(3):231.

9. Gillings MR. Integrons: past, present, and future. *Microbiol. Mol Biol Rev.* 2014; 78(2):257-77.
10. Amiri P, Pournajaf A, Shavalipour A, Tayebi Z, Goudarzi H, Eslami G, Et al. Evaluation of antimicrobial resistance in the beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection in the patients referring to Taleghani hospital of Tehran. *Tabari Biomedical Student Research Journal.* 2015; 1(2):11-9.
11. Christaki E, Marcou M, Tofarides A. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. *Journal of molecular evolution.* 2020;88(1):26-40.
12. Chung PY, Khanum R. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *Journal of microbiology, immunology and infection.* 2017;50(4):405-10.
13. Aminnezhad S, Kasra- Kermanshahi R. Antibiofilm activity of cell-free supernatant from *Lactobacillus casei* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Feyz.* 2014; 18(1): 30-7. [In Persian]
14. Isolauri E, Rautanen T, Juntunen M, Sillanauke P, Koivula T. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics.* 1991;88(1):90-7.
15. Gibson EM, Chace NM, London SB, London JA. Transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance from streptococci to lactobacilli. *Journal of bacteriology.* 1979; 137(1):614-9.
16. Pournajaf A, Rajabnia R, Razavi S, Solgi S, Ardebili A, Yaghoubi S, Et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from pediatric burns patients in an Iranian hospital. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 2018; 17(1):135-41.
17. Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* 1999;276(4):G941-50.
18. Zeighami H, Haghi F, Hajiahmadi F. Integrons and Their role in Antibiotic Resistance. *journal of laboratory and diagnosis* 2014; 5 (22): 61-71.
19. Soltan Dallal MM, Mobaiyen H, Mirak S. Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* and *ruteri* in *Acinetobacter baumannii* isolated from nosocomial infections. *J Shahrekord Univ Med Sci.* 2015; 17(5): 101-109. [In Persian]
20. Sharif R, Amini K. Effect of Iron Oxide Nanoparticles and Probiotic *Bifidobacterium bifidum* on *MexA* Gene Expression in Drug Resistant Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Research in Medicine.* 2019; 43 (3): 118-123.
21. Siedler S, Balti R, Neves AR. Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Current opinion in biotechnology.* 2019; 56:138-46.
22. Reis JA, Paula AT, Casarotti SN, Penna AL. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews.* 2012;4(2):124-40.
23. Carey CM, Kostrzynska M, Ojha S, Thompson S. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of microbiological methods.* 2008; 73(2):125-32.



Original Article

The Effect of *Lactobacillus Casei*-Free Floating Fraction on the Expression of Class I Integron Gene in Clinical Isolates of *Acinetobacter Baumannii* by Real Time PCR

Jalilyian A, Moradli GH*, Amini K

Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Received: 19 Sep 2020

Accepted: 29 Oct 2020

Abstract

Background & Objective: The most common way for the spread of resistance genes and the emergence of multidrug resistance (MDR)-*Acinetobacter baumannii* species is the presence of genetic elements called integrons. Therefore, in recent years, the use of probiotics has been recommended to reduce the complications of resistant bacteria and treatment failure. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of probiotic *Lactobacillus casei* supernatant on the expression of class 1 integron gene in *A. baumannii* isolates by Real time PCR.

Material & methods: Sixty clinical samples of blood, respiratory secretions, urine, and ulcers were collected from hospitals in Saveh, Iran. The presence of the *intI* gene was evaluated by PCR. After treatment with the sub-MIC strains of *L. casei* supernatant, mRNA was extracted and Real-time PCR was performed to determine the level of integron gene expression and finally the expression level was determined using ΔCt method. Expression analysis was performed by relative mRNA expression compared to the standard strain and it was performed in SPSS version 18 using t-test statistical analysis.

Results: Out of 12 isolates of *A. baumannii*, the prevalence of *IntI* gene was 100%. The fold change for the *intI* gene was -1.18, indicating that it decreased in the treated group compared to the untreated group ($P < 0.05$).

Conclusion: The results showed that the probiotic supernatant was able to reduce the expression of the *intI* gene; therefore, the use of probiotics as a supplement or alternative therapy in the drug-resistance microbial infections is recommended.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Integron, *Lactobacillus casei*, Real-time PCR

*Corresponding Author: Moradli Gholamali, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Email: moradli.mic@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-6622-2026>