مجله دنیای میکروب‌ها
سال یازدهم شماره سوم (پیاپی ۳۶) پاییز ۱۳۹۷
صفحات ۲۸۷-۲۷۸

Original Article

اثر *لاکتوباسیلوس های* پروبیوتیکی برقدرت اتصال و تشکیل بیوفیلم سویه های *اشریشیا کلی* جدا شده از عفونت دستگاه ادراری

سوده بندری[۱]، نازیلا ارباب سلیمانی*[۲]، الهه تاج بخش[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی،تهران، ایران، [۲]استادیار گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران، [۳]دانشیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: دانشمندان بر این باورند که باکتری های پروبیوتیک با مهار استقرار، ممانعت از اتصال و رشد *اشریشیا کلی اوروپاتوژن* قادر به بهبود عفونت های دستگاه ادراری می شوند. هدف از این پژوهش، بررسی اثر ضداتصالی دو باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* بر *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن است.

مواد و روش ها: ۳۵ نمونه ادراری از افراد مبتلا به عفونت مجاری ادراری از بیمارستان امام خمینی در تهران جمع آوری و بر اساس آزمایش های بیوشیمیایی متداول ۲۷ جدایه *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن تشخیص داده شد. قدرت تشکیل بیوفیلم باکتری ها و وجود ژن های موثر در تشکیل آن (*papG* و *fimH*) به ترتیب با روش های میکروتیتر پلیت و PCR بررسی شدند. تجمع پذیری و اثر ضد اتصالی دو *لاکتوباسیلوس* پروبیوتیکی، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* علیه باکتری *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن به ترتیب با روش کو-اگریگیشن و میکروتیتر پلیت بررسی شدند.

یافته ها: از ۲۷ جدایه به ترتیب ۷۷٪، ۱۵٪ و ۵٪ توان قوی، متوسط و ضعیف و ۳٪ فاقد توان برای تشکیل بیوفیلم بودند. از بین ۱۵ نمونه دارای بیوفیلم قوی، ۱۳ نمونه (۸۶٪) واجد ژن *papG* و ۱۵ نمونه (۱۰۰٪) واجد ژن *fimH* بودند. میانگین تجمع پذیری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* با باکتری *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن به ترتیب ۴۹/۱۳ و ۴۶/۲۵ درصد به دست آمد. میانگین اثر ضد اتصالی روماند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* علیه *باکتری بیماریزا* به ترتیب ۶۲ و ۵۸ درصد بود.

نتیجه گیری: انجام مطالعات گسترده تر در مورد ویژگی های ضد اتصالی *لاکتوباسیلوس* های پروبیوتیکی مورد پژوهش به منظور پیشگیری از استقرارسویه *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: اشریشیا کلی، عفونت ادراری، اثر ضد اتصالی، *لاکتوباسیلوس* های پروبیوتیکی.

دریافت مقاله: دی ماه ۹۶ پذیرش برای چاپ: اسفند ماه ۹۶

مقدمه

اتصال باکتری *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*) اوروپاتوژن به اپی تلیال دستگاه تناسلی- ادراری نه تنها امکان شروع استقرار این باکتری بر روی سطح سلول میزبان را فراهم می کند، بلکه مقاومت در برابر مکانیسم های پاکسازی میزبان مانند جریان ادرار را نیز افزایش می دهد (۱).

اتصال این باکتری به اپی تلیال دستگاه ادراری توسط تشکیل جوامع میکروبی مانند بیوفیلم صورت می گیرد. از مهمترین عوامل چسبنده که موجب تشکیل بیوفیلم و اتصال *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن می گردد می توان به پیلی P اشاره کرد که توسط ژن های *pap* کد می شود. این پیلی به طور تقریبی از ۱۰۰۰ زیرواحد PapA (پروتئین زیرواحد اصلی) تشکیل شده است که همراه با PapE، PapF (ساختارهای

*) آدرس برای مکاتبه: گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران.
تلفن: ۰۲۳۳۵۲۲۵۰۴۶ پست الکترونیک: nazilaarbab@yahoo.co.uk

زیرواحد کوچک) و نیز PapG (عامل چسبنده اتصالی به گیرنده) ساختار سختی را تشکیل می دهند. سه واریته مختلف از PapG وجود دارد (PapG I, II, III) که به گیرنده های متفاوتی متصل می شوند (۲). تفاوت در PapG، تروپیسم میزبانی متفاوت *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن را آشکار می سازد.

نمونه باکتری های درگیر در باکتریمی و پیلونفریت دارای فیمبریه هایی با عامل چسبنده اتصالی PapGII بوده اند در حالی که PapGIII با التهاب مثانه در انسان و عفونت های ادراری تناسلی در سگ ها و گربه ها همراه است. از دیگر عوامل اتصالی مهم این باکتری که در روند عفونت زایی دستگاه ادراری نقش ویژه ای دارد FimH است که تنها به گیرنده های تری مانوز متصل می شوند و در ۷۰ درصد جدایه های *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن وجود دارد (۳).

مطالعات نشان داده که علاوه بر تقویت برهم کنش های میزبان – باکتری، FimH می تواند تماس های بین باکتریایی را واسطه گری کرده و اتصال باکتری ها به یکدیگر (اتواگریگیشن) و تشکیل بیوفیلم را تحریک کند. این وقایع با واسطه FimH سویه های *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن را قادر به پایداری بهتر در برابر درمان های آنتی بیوتیکی و دفاع های ضدباکتریایی میزبان درون دستگاه ادراری می سازد (۳ و ٤).

به طور کلی اولین راه برای مبارزه با عفونت های دستگاه ادراری به ویژه عفونت های ناشی از *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن درمان با استفاده از آنتی بیوتیک ها است. اما امروزه ثابت شده است که به دلیل تشکیل بیوفیلم و همچنین ظهور مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری ها، استفاده از درمان آنتی بیوتیکی با محدودیت مواجه شده و پژوهش های زیادی برای یافتن راه های جایگزین درمان انجام شده اند. یکی از راه حل ها آنتی ادهسین تراپی است که در تلاش برای سدکردن اتصال باکتری و جلوگیری از تشکیل بیوفیلم باکتریایی است. از راه های دیگری که در چند دهه اخیر به این منظور آزموده شده استفاده از میکروارگانیسم های کومنسال یا سودمند مانند *لاکتوباسیلوس* های پروبیوتیکی برای رقابت و جلوگیری از اتصال باکتری های بیماری زاست (۳ و ۵).

باکتری های پروبیوتیک مانند *لاکتوباسیلوس* های پروبیوتیکی در اتصال به سطوح اپی‌تلیال با میکروارگانیسم‌های بیماریزا رقابت می‌نمایند و دارای توانایی اتصال اختصاصی و غیر اختصاصی برای جایگاه‌های هدف می‌باشند. اتصال اختصاصی زمانی صورت می‌گیرد که یک ادهسین (عامل چسبنده) که بر روی سطح سلول باکتری قرار دارد به یک گیرنده روی سطح سلول اپی‌تلیال میزبان متصل گردد که در اصطلاح این عملکرد قفل-کلید نامیده می‌شود. اتصال غیر اختصاصی باکتری های پروبیوتیکی پدیده متداول‌تری است که به واسطه ی نیروی آب گریزی یا الکترواستاتیک صورت می‌گیرد. اتصال غیر اختصاصی گرچه ممکن است برای استقرار بر روی سلول‌های اپی‌تلیال در شرایط درون تن کافی نباشد. اما احتمالاً در جذب سوبسترا و در نتیجه افزایش رشد موثر است (٦ و ۷).

از آنجائی که میکروارگانیسم‌های بیماریزا برای ایجاد بیماری ابتدا باید به سطوح متصل شوند و سپس از طریق فاکتورهای بیماریزایی شان منجر به بیماری گردند، این نقش باکتری های پروبیوتیک یکی از راه کارهای مبارزه با باکتری های بیماری زا است (۷ و ۸).

هدف از این تحقیق، ارزیابی تشکیل بیوفیلم باکتری *اشریشیا کلی* جدا شده از عفونت ادراری و سپس ارزیابی اثر ضد بیوفیلمی دوباکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* بر *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن بود.

مواد و روش ها

الف) جداسازی و خالص سازی باکتری *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن از نمونه ادرار: در مطالعه سال ۱۳۹۵ تعداد ۳۵ نمونه ادراری از افراد مبتلا به عفونت مجاری ادراری از بیمارستان امام خمینی جمع آوری شد. به منظور جداسازی *اشریشیا کلی* و اطمینان از خالص بودن نمونه ها، هر کدام از نمونه ها ابتدا به طور مجزا بر روی محیط کشت بلاد آگار (مرک، آلمان) و سپس بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار و ائوزین متیلن بلو آگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند. نمونه های خالص شده با آزمون های بیوشیمیایی متداول (بررسی سیترات به عنوان تنها

منبع کربن، تخمیر قندها و تولید گاز از تخمیر گلوکز در محیط تریپل شوگر آیرون آگار، بررسی جلای فلزی، آنزیم تریپتوفاناز و اوره آز) برای باکتری *اشریشیا کلی* تایید شدند. پس از انجام این کار مشخص گردید که ۲۷ نمونه حاوی باکتری *اشریشیا کلی* است. سویه های تایید شده *اشریشیا کلی* با روش گلیسرول استوک برای ذخیره سازی (در فریزر ۲۰- درجه سلیسیوس) نگهداری شدند، تا در آزمون های دیگر مورد استفاده قرار گیرند (۹).

ب) بررسی تشکیل بیوفیلم باکتری *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن، به منظور بررسی تشکیل بیوفیلم این باکتری، ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری (۱/۵×۱۰^{۸} CFUml) به لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط مایع استریل لوریا برتانی تلقیح شد. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محیط ۱۰ میلی لیتری به داخل چاهک های میکروپلیت ریخته شد. چاهک شاهد حاوی محیط کشت مایع استریل لوریا برتانی بود. سپس گرماگذاری به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سلیسیوس انجام شد. در مرحله بعد محتوی داخل چاهک ها خالی و شستشوی چاهک ها ۳ بار با سرم فیزیولوژی استریل انجام شد. به منظور تثبیت سلول ها به چاهک ها اتانول ۹٦٪ اضافه شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، محتوبات چاهک ها تخلیه و در دمای آزمایشگاه اجازه داده شد تا خشک شوند. هر چاهک با کریستال ویوله ۲٪ رنگ آمیزی و پس از ۵ دقیقه، چاهک ها با آب شهری به آرامی شسته و با اسید استیک ۳۳٪ به عنوان حلال پر شدند. پس از ۱۵ دقیقه گرماگذاری پلیت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس جذب نوری چاهک های رنگ شده با کریستال ویوله در ٤۹۲ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد (۱۰).

ج) بررسی وجود ژن های موثر در تشکیل بیوفیلم papG و fimH اشریشیا کلی اوروپاتوژن: در ابتدا DNA باکتری های *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن با قدرت بیوفیلم بالا با کیت استخراج DNA تهیه شده از شرکت زیست دانش یاران استخراج گردید. سپس PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از مخلوط تجاری شرکت زیست فناوری پیشگام (۲/۵ میکرولیترPCR بافر، ۱ میکرولیترکلرید منیزیم، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم DNA Taq Polymerase)، ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۱۷/۸ میکرولیتر آب مقطر و ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای اختصاصی ژن های *pap*G و *fim*H (جدول ۱) انجام شد. برنامه دمایی مخصوص این ژن ها در ۳۵ سیکل تکثیر انجام گرفت. جداسازی دو رشته در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۱۸۰ ثانیه، جداسازی ثانویه رشته ها در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه، اتصال پرایمرها *pap*G (۵۹ درجه سلیسیوس) و *fim*H (۵۷ درجه سلیسیوس) به مدت ۷۰ ثانیه، طویل شدن رشته هدف در ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و طویل شدن نهایی رشته ها به مدت ۳۰۰ ثانیه انجام شد (۱۱ و ۱۲). محصول PCR حاصل به کمک الکتروفورز در حضور مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد مشاهده گردید.

د) بررسی اثر ضد اتصالی لاکتوباسیلوس های پروبیوتیکی با استفاده از روش تجمع پذیری کواگریگیشن بر باکتری اشریشیا کلی اوروپاتوژن: بر اساس این آزمون میزان قدرت *لاکتوباسیلوس* های پروبیوتیکی در اتصال به *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن، به دام انداختن و مهار عملکرد آنها مشخص می شود. ابتدا باکتری های پروبیوتیک در محیط MRS براث کشت داده شدند و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس در جار بی‌هوازی گرماگذاری شدند. کشت شبانه از *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن در محیط لوریا برتانی در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس تهیه شد. *لاکتوباسیلوس* های پروبیوتیکی

جدول ۱. مشخصات پرایمر های ژن های *pap*G و *fim*H.

ژن	توالی	طول توالی محصول PCR (جفت باز)	منبع
***fim*H**	F: 5”-GTCCCAATTCCTACCGTT-3” R: 5”-TGGAATAATCGTACCGTTGCG-3”	۱٦٤	(۱۰)
***pap*G**	F: 5”-CTGTAATTACGGAAGTGATTTCTG-3” R: 5”-CTGTAATTACGGAAGTGATTTCTGTCCAGA-3”	۱۱۹۰	(۲۰)

و باکتری های مورد آزمایش با دستگاه سانتریفیوژ در دمای ۲۰ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه و با دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ و سپس توسط بافر فسفات شستشو داده شدند. سپس روماند خارج شد و از رسوب باقی مانده در انتهای لوله سوسپانسیون باکتریایی در بافر فسفات تهیه شد. میزان جذب نوری ۰/٤ در طول موج ٦٦۰ نانومتر برای هر نمونه سوسپانسیون باکتریایی تهیه شد. ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه باکتری پروبیوتیک و ۵۰۰ میکرولیتر از باکتری های بیماریزا و شاهد با یکدیگر مخلوط شدند و به مدت ٤ ساعت در ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری گردیدند. پس از ٤ ساعت هر لوله اپندورف حاوی مخلوط باکتری پروبیوتیک و باکتری بیماریزا یا شاهد مجدداً با دور rpm ۱٦۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سلیسیوس سانتریفیوژ شدند. روماند از نظر میزان جذب نوری در طول موج ٦٦۰ ناتومتر بررسی گردید و میزان تجمع یافتن بر اساس فرمول زیر محاسبه شد. آزمایش ها در سه تکرار انجام شدند.

درصد تجمع یافتن = A1-A2/A1×100

A1 میزان جذب نوری بلافاصله پس از مخلوط کردن پروبیوتیک‌ها و باکتری های مورد نظر است و A2 میزان جذب نوری سوپرناتانت پس از ٤ ساعت می باشد. در این آزمایش به عنوان کنترل هر باکتری به تنهایی بررسی شد (۱۳ و ١٤).

ه) بررسی اثر ضد اتصالی روماند لاکتوباسیلوس های پروبیوتیکی بر باکتری اشریشیا کلی اوروپاتوژن: در این آزمون ابتدا باکتری های پروبیوتیک در محیط MRS براث کشت و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس و جاربی هوازی گرماگذاری شدند. کشت شبانه از باکتری های *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن نیز در محیط لوریا برتانی براث تهیه شد. سپس روماند پروبیوتیک ها و نیز سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند از *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن تهیه شد. ابتدا ۷۵ میکرولیتر از روماند *لاکتوباسیلوس* های پروبیوتیکی و سپس ۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون نمونه باکتری *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن به چاهک ها اضافه شد. آزمایش برای هر کدام از نمونه های *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن در مجاورت هر دو پروبیوتیک به طور جداگانه در سه تکرار انجام شد. میکروپلیت به مدت ٢٤ ساعت در شرایط دمایی ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری شد. در چاهک های شاهد محیط کشت استریل ریخته شد. پس از ٢٤ ساعت گرماگذاری محتویات چاهک ها خارج و هر چاهک سه بار توسط بافرفسفات شستشو داده شد. پس از خشک شدن کامل چاهک ها، برای تثبیت سلول ها از ۲۰۰ میکرولیتر اتانل ۹٦٪ به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. پس از سپری شدن این زمان محتویات چاهک ها خارج و پس از خشک شدن، سلول ها با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲٪ به مدت ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند. سپس محتویات هر چاهک خالی و میکروتیتر پلیت در مسیر جریان ملایم آب شیر قرار گرفت تا رنگ کاملاً شسته شود. در نهایت پس از خشک شدن چاهک ها در معرض هوا، ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳٪ به عنوان حلال به چاهک ها اضافه و میزان جذب نوری در طول موج ٤۹۰ نانومتر برای هر چاهک اندازه گیری شد. در نهایت میزان کاهش اتصال از فرمول زیر محاسبه شد:

درصد کاهش اتصال = ODa-ODb/ODa×100

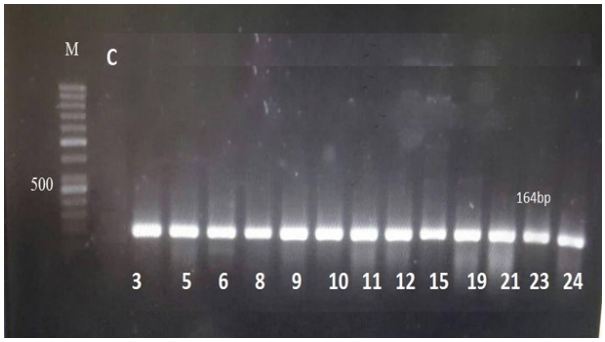
ODa بیانگر جذب نوری چاهک آزمایش و ODb جذب نوری چاهک شاهد است (۹، ۱۳ و ۱۵).

و) آنالیز آماری: داده های حاصل از نتایج بدست آمده از این مطالعه با نرم افزار نسخه شانزدهم SPSS و انحراف معیارها با نرم افزار EXCEL مورد آنالیز قرار گرفتند.

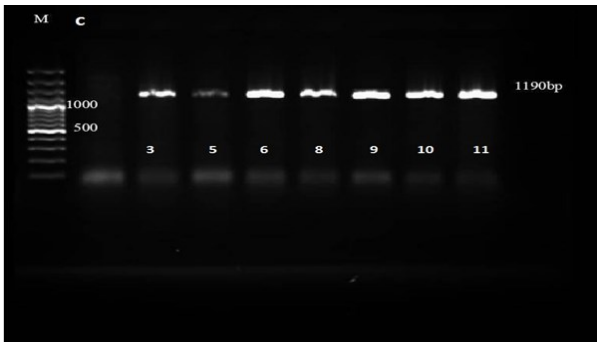
یافته ها

الف) تشکیل بیوفیلم باکتری اشریشیا کلی اوروپاتوژن: از ۳۵ نمونه ادراری جمع آوری شده، ۲۷ جدایه باکتری *اشریشیا کلی* بر اساس آزمون های بیوشیمیایی تشخیص داده شدند که ۷۷٪ از آن ها دارای بیشترین توان، ۱۵٪ توان متوسط، ۵٪ دارای میزان توان ضعیف برای تشکیل بیوفیلم بودند و در ۳٪ از نمونه ها تشکیل بیوفیلم مشاهده نگردید.

ب) تایید وجود دو ژن papG و fimH دخیل در بیوفیلم اشریشیا کلی اوروپاتوژن: با انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز بر روی DNA استخراج شده از باکتری های *اشریشیا کلی*،



شکل ۱: الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *papG* . M) مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی، C) کنترل منفی، بقیه ستون ها) نمونه های حاوی ژن *papG* (قطعه ۱٦٤ جفت باز).



شکل ۲: الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *fimH* . M) مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی، C) کنترل منفی، بقیه ستون ها) نمونه های حاوی ژن *fimH* (قطعه ۱۱۹۰ جفت باز).

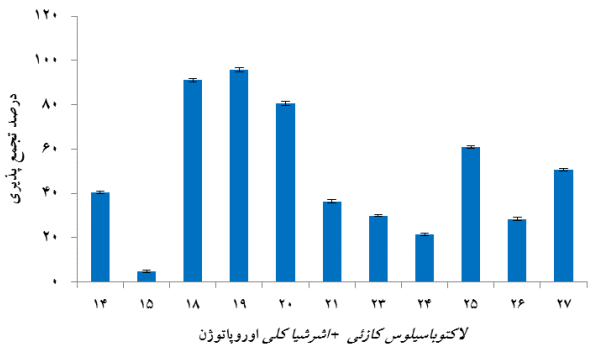
مشخص شد که از بین ۱۵ نمونه، باکتری هایی که در آزمون های میکروبی توان بالای تشکیل بیوفیلم را داشتند، ۱۳ نمونه (۸٦٪) واجد ژن *papG* و ۱۵ نمونه (۱۰۰٪) دارای ژن *fimH* بودند (شکل های ۱ و ۲).

ج) تجمع پذیری لاکتوباسیلوس های پروبیوتیکی با اشریشیا کلی اوروپاتوژن: بر اساس این آزمون میزان قدرت باکتری های پروبیوتیک در اتصال به باکتری‌های بیماریزا و مهار عملکرد آنها مشخص شد. میانگین تجمع پذیری *لاکتوباسیلوس* پلانتاروم و *لاکتوباسیلوس* کازئی با باکتری *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن به ترتیب ٤۹/۱۳ و ٤٦/۲۵ درصد به دست آمد. بر اساس نتایج ارائه شده در نمودار های ۱ و ۲، پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* دارای توان تجمع پذیری بیشتری نسبت به پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* با باکتری *اشریشیا کلی اوروپاتوژن* بود اگرچه در بررسی تکی نمونه ها در بعضی نمونه ها، میزان تجمع پذیری *لاکتوباسیلوس کازئی* بیشتر از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود به عنوان مثال، بیشترین میزان تجمع پذیری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس کازئی* با *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن به ترتیب برابر با ٦۸ درصد (نمونه شماره ۲۱) و ۹٤ درصد (نمونه شماره ۱۹) درصد بود.

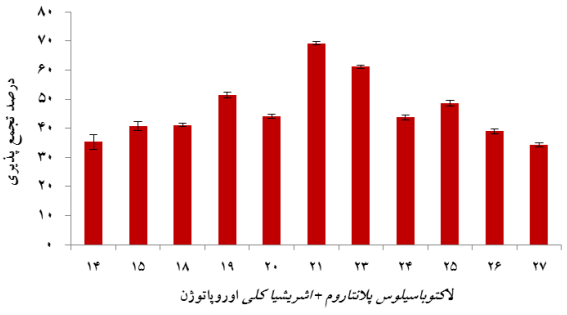
د) اثر ضد اتصالی روماند لاکتوباسیلوس های پروبیوتیکی بر باکتری اشریشیا کلی اوروپاتوژن: بیشترین میزان میانگین اثر ضد اتصالی روماند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* علیه *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن به ترتیب ٦۲ و ۵۸ درصد به دست آمد. در نمودارهای ۳ و ٤ اثر ضد اتصالی دو *لاکتوباسیلوس* های پروبیوتیکی نشان داده شده است.

بحث

باکتری *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن عامل عفونت های شایع

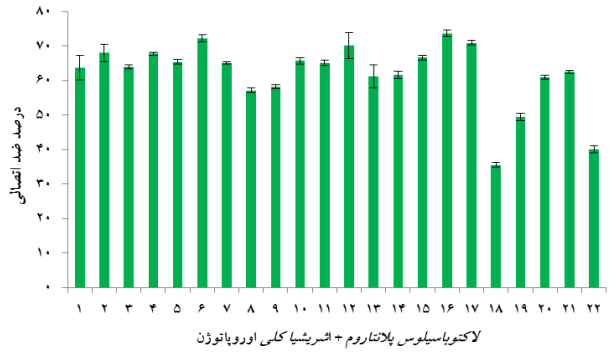


نمودار ۱: درصد تجمع پذیری *لاکتوباسیلوس کازئی* با برخی جدایه های *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن



نمودار ۲: درصد تجمع پذیری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با برخی از جدایه های *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن

نمودار ۳: اثر ضد اتصالی رواند *لاکتوباسیلوس کازئی* بر *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن



نمودار ٤: اثر ضد اتصالی روماند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن

دستگاه تناسلی ادراری است و مشکل رایج در این نوع عفونت ها برگشت بیماری است (١٦). پایداری برخی سویه های این باکتری در دستگاه ادراری به توانایی باکتری برای تشکیل بیوفیلم نسبت داده می شود (١٧). عوامل اتصالی اولیه این باکتری شامل پیلی تیپ ١، P، S هستند که به ترتیب توسط اپران های *fim*، *pap*، *sfa* کد می شوند (١٢).

در مطالعه حاضر تشکیل بیوفیلم *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن با روش میکروتیترپلیت بررسی شد که ٧٧٪ از جدایه ها دارای بیشترین توان، ١٥٪ توان متوسط، ٥٪ دارای میزان توان ضعیف برای تشکیل بیوفیلم بودندو در ٣٪ از نمونه ها تشکیل بیوفیلم مشاهده نگردید.

امینی (Amini) و همکاران در سال ١٣٩٢، با روش تشکیل بیوفیلم در میکروتیترپلیت نشان دادند، ٦٠٪ نمونه های عفونت ادراری جدا شده از بیمارستان های استان سمنان، دارای بیوفیلم با قدرت بالا، ١٦٪ دارای بیوفیلم با قدرت متوسط، ٢٠٪ بیوفیلم ضعیف و ٤٪ فاقد قدرت تشکیل بیوفیلم بودند (١٨). تاج بخش (Tajbakhsh) و همکاران در سال ٢٠١٥ در طی تحقیقی نشان دادند از ١٠٨ نمونه *اشریشیا کلی* جدا شده ٦١/٥٣٪ آن ها قدرت تشکیل بیوفیلم را داشتند که از میان تشکیل دهندگان بیوفیلم به ترتیب ١٩٪ و ٢٠٪ قدرت تشکیل بیوفیلم قوی و متوسط را داشتند (١٢)، که با نتایج بدست آمده از این تحقیق تا حدی مشابه بود. اندک تفاوت را شاید بتوان به دلیل تفاوت منطقه جغرافیایی، شرایط مصرف غذایی و دارویی افراد مورد بررسی، نوع محیط کشت استفاده شده و مصرف آنتی بیوتیک قبل از آزمایش دانست.

بر اساس نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر از ١٥ نمونه مورد بررسی، ١٥ نمونه (١٠٠ درصد) دارای ژن *fim*H و ١٣ نمونه (٨٦ درصد) دارای ژن *pap*G بودند. گاروفالو (Garofalo) و همکاران در سال ٢٠٠٧ بالاترین میزان وجود *fim*H (١٠٠ درصد) را در ١٨ نمونه *اشریشیا کلی* جدا شده از نمونه های ادراری گزارش کردند (١٩). تارکونا (Tarchouna) و همکاران در سال ٢٠١٣، اعلام نمودند که از میان ژن های مورد مطالعه در سویه های *اشریشیا کلی*، ژن *fim*H شایع ترین ژن (٦٨) درصد می باشد (٢٠).

حضور ژن *pap*G در نمونه های *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن مورد بررسی در مطالعه جیاری (Giray) و همکاران در سال ٢٠١٢ که بر روی ٧٥ بیمارمبتلا به عفونت مثانه (سیستیت) و عفونت کلیه (پیلونفریت) انجام گرفت برابر با ٣٢ درصد بود (٢١). با توجه به میزان متغیر وجود ژن *pap*G در انواع نمونه های *اشریشیا کلی*، به نظر می رسد که بیان یا عدم بیان این ژن در جدایه های بالینی، به تنهایی شاخص دقیقی نیست. بلکه شرایطی چون نوع بیماری و شرایط بالینی بیمار نیز می تواند بر این شاخص موثر باشد. امروزه محققین بر این باورند که مهار اتصال باکتری به سطوح اپیتلیال ادراری به دلیل تعاملات بین مولکول های اتصالی باکتریایی و گیرنده های دستگاه ادراری، می تواند برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم ها قابل توجه باشد (٢٢).

در این تحقیق میانگین اثر ضداتصالی روماند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* علیه *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن به ترتیب ٦٢ و ٥٨ درصد بدست آمد اگر چه در برخی از نمونه ها اثر ضد اتصالی *لاکتوباسیلوس کازئی* بسیار بیشتر از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود. نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر تا حدی شبیه نتیجه بدست آمده از مطالعه صدری (Sadri) و همکاران در سال ۱۳۹۵ بود که اثر ضد اتصالی *لاکتوباسیلوس کازئی* بر باکتری *اشریشیا کلی* اوروپاتوژنیک را در حدود ٤٦/٧٪ گزارش کردند (۹).

یکی از دلایل مهم تفاوت درنتایج تحقیقات بر روی اثر ضد اتصالی کشت کامل و سوپرناتانت باکتری های پروبیوتیک را شاید بتوان به اثر وجود سلول باکتری علاوه بر متابولیت های موثر در کشت کامل نسبت داد که در رقابت برای جایگاه اتصالی نسبت به متابولیت ها موفق تر است.

در مطالعه حاضر میانگین تجمع پذیری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* با باکتری *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن به ترتیب ٤٩/١٣ و ٤٦/٢٥ درصد به دست آمد که تا حد زیادی شبیه نتایج به دست آمده از تحقیقات ارشادیان (Ershadian) و همکاران در سال ١٣٩٤ و صدری (Sadri) و همکاران در سال ۱۳۹۵ بود که تجمع سلولی *لاکتوباسیلوس* های پروبیوتیکی با باکتری های بیماریزا را مطالعه کردند (۹ و ۱۳).

نتیجه گیری

از آنجایی که اتصال اولین مرحله برای شروع بیماریزایی است با کنترل آن می توان از شروع بیماری جلوگیری کرد. از این رو این تحقیق باهدف ارایه راه جدید پیشگیری-درمانی بدون عوارض جانبی انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد که دو *لاکتوباسیلوس* پروبیوتیکی (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی*) قادرند با به دام انداختن و تجمع پذیری با باکتری *اشریشیا کلی* اوروپاتوژن سبب کاهش اتصال و مانع تشکیل بیوفیلم آن در شرایط آزمایشگاهی شوند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از آقای مهندس طوماری مسئول محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران به دلیل همکاری صمیمانه کمال امتنان را دارند.

References

1. Travis JW, Richard RK, Matthew AM. Origins and virulence mechanisms of Uropathogenic *Escherichia coli*. Exp Mol Pathol. 2008; 85: 11-19.

2. Maryam GS, Mohsen M, Shahin NP. Frequency of papaA, papC genes and antimicrobial resistance pattern in uropathogenic *Escherichia coli*. J World Microbiol. 2016; 9(1): 44-52. [In Persian]

3. Da SGJ, Mendonça N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. Vir. 2012; 3(1): 18-28.

4. Lloyd AL, Henderson TA, Vigil PD, Mobley HL. Genomic islands of uropathogenic *Escherichia coli* contribute to virulence. J Bacteriol. 2009; 1: 191(11): 3469-3481.

5. 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.

6. Bermudez BM, Plaza DJ, QS M, LC G, Gil A. Probiotic mechanisms of action. Ann Nutr Metab. 2012; 61: 160-174.

7. 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.

8. Watson RR, Preedy VR. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Bioactive foods in health promotion. 1st ed. Academic Press; 2015.

9. Sadri M, Arbab Soleimani N, Forghanifard MM. The study of antimicrobial and anti-adhesive effect of probiotic *Lactobacilli* on uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC). Biol J Microorganism. 2016; 5(17): 159-170. [In Persian]

10. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Bonaventura GD, Djukic S, Cirkovic I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. Apmis. 2007; 115(8): 891-899.

11. Hojati Z, Zamanzad B, Hashemzade M, Molaie R, Gholipour A. The *fimH* gene in uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infection. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8(2): e17520.

12. Tajbakhsh E, Ahmadi P, Abedpour-Dehkordi E, Arbab-Soleimani N. Khamesipour F. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic *E. coli* isolated from clinical samples in Iran. Antimicrob Resist Infect Control. 2016; 5: 11.

13. Ershadian M, Arbab Soleimani N, Ajoudanifar H, Vaezi Khakhki MR. The antimicrobial and co-aggregation effects of probiotic lactobacilli against some pathogenic bacteria. Iran J Med Microbiol. 2015; 9(3): 14-22. [In Persian]

14. Sahoo TK, Jena P K, Nagar N, Patel AK, Seshadri S. In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria from the gut of Labeo rohita and Catla catla. Probiotics Antimicrob Proteins. 2015; 7(2): 126-136.

15. Abedi DF, Jafarian DA. In vitro anti- bacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* on *Escherichia coli*. Res Pharm Sci. 2013; 8(4): 260-268.

16. Tapiainen T, Hanni AM, Salo J, Ikaheimo I, Uhari M. *Escherichia coli* biofilm formation and recurrences of urinary tract infections in children. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014; 33: 111-115.

17. Kravchick S, Cytron S, Agulansky L, Bendor D. Acute prostatitis in middle-aged men: a prospective study. Brit J Urol Int. 2004; 93(1): 93-96.

18. Amini Z, Arbab Soleimani N, Tajbakhsh E. Study of adhesive factor and biofilm formation of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patient with urinary tract infection in Semnan province. Pejouhandeh J. 2014; 6(96): 332-336. [In Persian]

19. Garofalo CK, Hooton TM, Martin SM, Stamm WE, Palermo JJ, Gordon JI. *Escherichia coli* from urine of female patients with urinary tract infections is competent for intracellular bacterial community formation. Infect Immun. 2007; 75: 52-60.

20. Tarchouna M, Ferjani A, Ben SW, Boukadida J. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. Int J Inf Dis. 2013; 17: 450-453.

21. Giray B, Ucar FB, Aydemir SS. Characterization of uropathogenic *Escherichia coli* strains obtained from urology outpatient clinic of Ege Medical Faculty in İzmir. Tur J Med Sci. 2012; 42: 1328-1337.

22. Sabina F. Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. Int J Environ Res Public Health. 2014; 11(5): 4745-4767.

Journal of Microbial World
Volume 11, No. 3, September 2018

Original Article

The effect of probiotic lactobacilli on the attachment power and biofilm formation of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections

Soudeh Bandari[1], Nazila Arbab Soleimani[2], Elahe Tajbakhsh[3]

[1]M.Sc. student, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
[3]Associated Professor, Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Scientists are of the conviction that probiotic bacteria can ameliorate urinary tract infection by inhibiting colonization, attachment, and growth of uropathogenic *Escherichia coli*. The aim of this research was to investigate the anti-adhesive effect of two probiotic Lactobacilli including *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* on uropathogenic *E. coli* (UPEC).

Materials & Methods: In research in 1395, 35 urinary tract infection (UTI) samples were collected from one hospital in Tehran and based on biochemical analysis 27 UPEC samples were identified. The ability of biofilm-formation and the presence of genes (*papG* and *fimH*) involved in biofilm-formation was investigated by microtiter plate and PCR methods, respectively. Co-aggregation and anti-adhesive effects of two probiotic lactobacilli including *L. plantarum* and *L. casei* against UPEC were studied by co-aggregation and microtiter plate method, respectively.

Results: Among 27 isolates, 77%, 15%, and 5% showed strong, mediate and the weak ability of biofilm-formation, respectively, and 3% had no ability. Among 15 UPEC which had a strong biofilm-formation ability, 13 (86%) and 15 (100%) had *papG* and *FimH* genes, respectively. The average of co-aggregation between *L. planetarium* and *L. casei* with UPEC was gained 49.13% and 46.25%, respectively. The mean anti-adhesive effect of *L. plantarium* and *L. casei* against pathogenic bacterium was 62% and 58%, respectively.

Conclusion: Further studies on the anti-adhesive effect of probiotic lactobacilli are suggested to prevent UPEC prevalence.

Keywords: *Escherichia coli*, Urinary infection, Anti-adhesive effect, Probiotic *Lactobacilli*.

Correspondence to: Nazila Arbab Soleimani

Tel: +98 2335225046

E-mail: nazilaarbab@yahoo.co.uk

Journal of Microbial World 2018, 11(3): 278-287.