مقاله پژوهشی

تأثیربخشی شناور فاقد سلول *لاکتوباسیلوس کازئی* بر بیان ژن اینتگرون کلاس یک در جدایه‌های بالینی *اسنیتوباکتر 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 دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۶/۲۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۸/۰۸

چکیده

زمینه و هدف: شایع‌ترین راه انتشار ژن‌های مقاومتی و پیدایش گونه‌هایی با مقاومت چندگانه (MDR) در *اسینتوباکتر بومانی*، وجود عناصر ژنتیکی بنام اینتگرون است. ازاین‌رو در سال‌های اخیر استفاده از پروبیوتیک‌ها در کاهش عوارض باکتری‌های مقاوم و شکست درمانی توصیه‌شده است. لذا، هدف از انجام این پژوهش تأثیر سوپرناتانت پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی بر بیان ژن اینتگرون کلاس ۱ در جدایه‌های اسنیتوباکتر 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 به‌منظور تعیین سطح بیان ژن اینتگرون انجام گرفت و درنهایت 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 *استینوباکتر بومانی* به‌دست‌آمده، 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 کاهش‌یافته است ($P< 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که سوپرناتانت پروبیوتیکی توانست میزان بیان ژن *intI* را کاهش دهد؛ بنابراین استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان مکمل یا جایگزین‌درمانی 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: *اسینتوباکتر بومانی*، لاکتوباسیلوس کازئی، اینتگرون، PCR-Real time

مقدمه

اسینتوباکتر بومانی یک کوکو باسیل گرم منفی هوازی فرصت‌طلب و غیر تخمیری در حال گسترش است که گروه‌های مختلفی از مردم، به‌ویژه بیماران بستری‌شده بیمارستان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱). باکتریمی، پنومونی، مننژیت، عفونت‌های مجاری ادراری و عفونت‌های زخم شایع‌ترین عفونت‌هایی است که به‌وسیله این ارگانیسم ایجاد می‌شود (۲). میزان مشارکت *اسینتوباکتر 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 *اسینتوباکتر 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 *اسینتوباکتر بومانی* نقش دارند و دراین‌بین،

*نویسنده مسئول: **غلامعلی مرادلی**، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ایران

Email: moradli.mic@gmail.com

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

مطالعات مختلف نشان می‌دهند که مقاومت چند داروئی 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 نوترکیبی 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، دزانفکتانت‌هاست (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 درزمینهٔ طراحی و ساخت داروهای شیمیایی ایجاد کرده‌اند (۱۱). این باکتری‌ها به‌سرعت به انواع مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌شوند، درنتیجه روند درمان عفونت‌های حاصله از این باکتری‌ها با مشکل مواجه شده است (۱۲).

لاکتوباسیلوس کازئی یک باکتری گرم مثبت، مزوفیل هموفرمنتاتیو 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 ازجمله 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). ازاین‌رو به نظر می‌رسد باکتری مذکور می‌تواند جایگزین مناسبی برای داروهای ضد میکروبی رایج قبلی باشد (۱۵). لذا هدف از این پژوهش تأثیر سوپرناتانت پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* بر بیان ژن اینتگرون *اسنیتوباکتر 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 ازجمله رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز و کاتالاز، اکسیداسیون گلوکز، دکربوکسیلاسیون لیزین، هیدرولیز آرژنین، سیمون سیترات، اکسیداسیون/تخمیر (O/F)، TSI، SIM و اوره شناسایی شدند. پس از تائید نهایی باکتری‌های جداشده ازنظر جنس و گونه به‌عنوان اسینتوباکتر بومانی، کلنی‌های باکتری وارد محیط نگه‌دارنده گردید. محیط نگه‌دارنده شامل محیط تریپتی کیس سوی براث (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 فوروارد: F=5′- GACGATGCGTGGAGACC- 3′ و ریورس R=5′- ′ CTTGCTGCTTGGATGCC -3 با طول محصول آمپلیکون ۱۲۰ جفت باز توسط شرکت پیشگام (تهران)، صحت آن‌ها در سایت NCBI و با استفاده از نرم‌افزار BLAST مورد تائید قرار گرفتند (۱۶). واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۸/۵ میکرولیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی (0.05 U/µl) Taq DNA polymerase، (3 mM $MgCl_2$) و (0.4mM) dNTPs، 1 میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (F و R) به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰

نانوگرم) و ۱۳/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانت 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 موردمطالعه، 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 میکرودایلوشن براث

از غلظت‌های موردنظر از ۲۵۰ تا ۰/۱۲ برای سوپرناتانت عاری از سلول (cell-free supernatant) سویه *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC 1608 تهیه‌شده از مرکز کلکسیون میکروبی ذخایر زیستی ایران استفاده شد. برای بهبود رشد و غنی‌سازی، روی محیط براث de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) کشت داده شدند و سپس به مدت ۲۴ ساعت و باوجود مکمل ۰/۰۵٪ سیستیین و در گرمخانه ۳۷ °C گرمخانه گذاری شدند و پس‌ازآن با استفاده از Phosphate-buffered saline (PBS) مقدار 10^7 CFU سوسپانسیون از باکتری‌ها تهیه شد. به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۲۴ ساعته *استرپتوباکتر بومانی* حامل ژن intI اضافه گردید. همچنین میزان ۱۰۰ میکرولیتر 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 پلیمراز به میزان ۰/۱ mg/ml از *لاکتوباسیلوس کازئی* از غلظت sub-MIC در حجم ۲۰ میلی‌لیتر در محیط لوریا برتانی براث (مرک، آلمان) ریخته و معادل نیم مک فارلند به آن *استرپتوباکتر 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. به‌منظور استخراج RNA از میکروکیت RNeasy (شرکت Qiagen) استفاده شد و برای حذف DNA ژنومی از کیت DNase Qiagen استفاده شد. بررسی کمی RNA استخراج‌شده از روش جذب نوری (nm ۲-OD=۲۶۰/۲۸۰=۱/۸) استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم Reverse AMV با غلظت 25 lμ/unit (شرکت Roche) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرو لیتر با استفاده از کیت شرکت (Genet bio CAT. NO: Q910) کره جنوبی به‌صورت زیر انجام شد: ۱۰ میکرو لیتر از Prime Qmaster mix (2x) with syber green، 5 میکرو لیتر از Depc water، یک میکرو لیتر از پرایمر فوروارد، یک میکرولیتر از پرایمر ریورس، یک میکرولیتر از Rox dye و ۲ میکرولیتر از cDNA استفاده شد. تکثیر قطعه‌های موردنظر در دستگاه Corbet با برنامه دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، تکثیر شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن خانگی 16s rRNA به‌عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد. سپس برای محاسبه میزان بیان ژن اینتگرون و رسم نمودارهای مربوطه از نرم‌افزار مشخص و مقدار بیان ژن هدف محاسبه شد (۱۷).

آنالیز آماری

آنالیز میزان بیان با اندازه‌گیری 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 معنی‌داری در این مطالعه کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. همچنین Confidence Level با ضریب اطمینان ۹۵٪ محاسبه گردید.

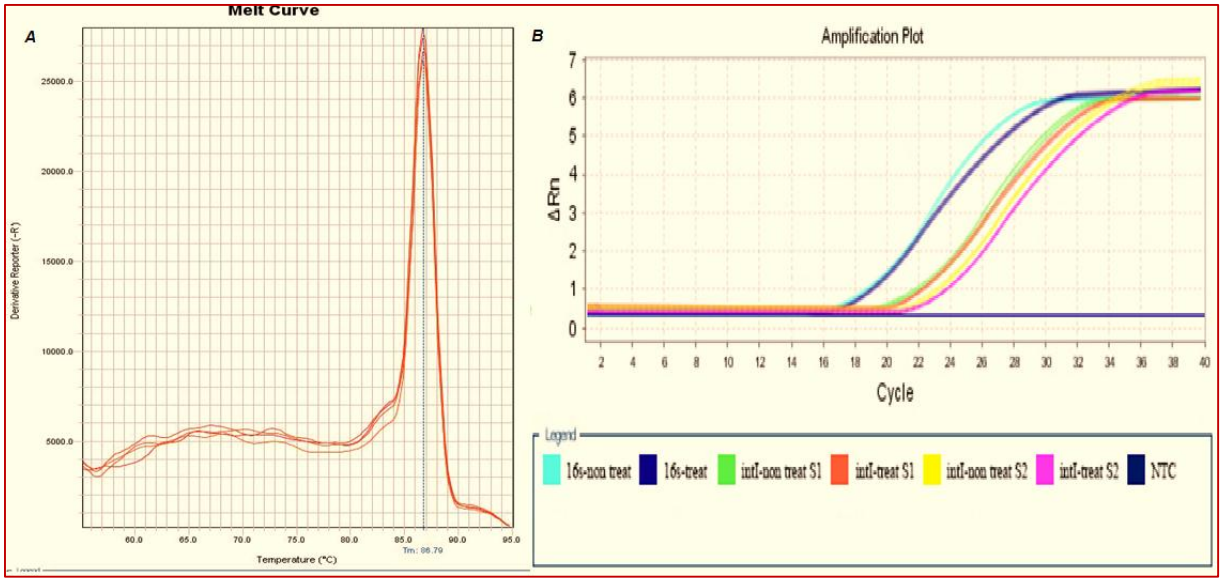
نتایج

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 میانه ۸±۳۲ 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٪) *استرپتوباکتر بومانی* با استفاده از آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی به دست آمد که همگی آن‌ها حامل ژن intI بودند. نتایج آزمون MIC به روش میکرودایلوشن برای CFS پروبیوتیک در برابر سویه‌های اینتگرون مثبت

اسینتوباکتر بومانی برابر µg/ml ۶۲/۵ بود. نتایج آزمون منحنی دما (melt curve) در آزمون real-time PCR نشان داد که بهترین دما جهت تکثیر پرایمرهای استفاده‌شده Tm=86.79 °C بود (شکل ۱A). همچنین نمودار تکثر 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-value=۰/۰۲۶) که بیانگر معنادار بودن اختلاف بیان این دو ژن در بین دو گروه تیمار شده و تیمار نشده است (Fold Change=-۱/۱۸).

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 پلانتاروم* 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



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

بحث

عفونت با سویه‌های مقاوم به درمان *آسینتوباکتر بومانی* دارای عوارض جانبی کلینیکی شامل؛ طولانی شدن زمان بستری، افزایش هزینه‌های درمانی و مرگ‌ومیر بالا است (۵). ازاین‌رو یافتن راهکاری که بتواند دارای عوارض جانبی کم، عدم تحمل هزینه بالا و در دسترس بودن موردتوجه است (۶). پروبیوتیک‌ها و ازجمله لاکتوباسیلوس‌ها که دارای نقش مهارکننده بر روی برخی از پاتوژن‌ها را دارند امروزه مورد استقبال قرارگرفته‌اند. 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، مشهود بود. در تناقض بامطالعه 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 مهاری و آنتی باکتریال با پتانسیل ضعیفی برای کاهش عملکرد پمپ افلاکس MexAB-OprMدر *سودوموناس آئروژینوزا* را دارد (P>۰/۰۵) (۲۰). این اختلاف می‌تواند درنتیجه نوع میکروب مطالعه شده، ژن تحت بررسی و سویه پروبیوتیکی مورداستفاده 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

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 ویرولانس باکتری‌های پاتوژن را کاهش دهند. از نقاط قوت پژوهش فعلی می‌توان به استفاده از سویه بومی پروبیوتیک و انتخاب سویه مقاوم به درمان اسینتوباکتر 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 اسینتوباکتر نشان 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. به‌طورکلی با توجه به‌ضرورت 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.

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, Sillanaukee 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 labratory 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

Journal of Advanced Biomedical Sciences; 10 (2020): 2768-2774